

**ISOLIERUNG VON MENSCHLICHEN IMMUNGLOBULIN-
GENEN UND CHARAKTERISIERUNG EINER
TRANSLOZIERTEN GENGGRUPPE**

HANS-GÜNTHER BAUER

1986

**Isolierung von menschlichen Immunglobulin-Genen
und Charakterisierung einer translozierten Gengruppe**

**Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München**

**vorgelegt von
Hans-Günther Bauer
aus Vöhringen**

München 1986

vorgelegt am: 4.3.1986

- 1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Böck
- 2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schmieger
- Sondervotum: Prof. Dr. H.G. Zachau

Tag der mündlichen Prüfung: 30.5.1986

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit von Mai 1982 bis Oktober 1985 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H.G. Zachau danke ich für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung. Außerdem danke ich allen Kollegen der Abteilung für gute Zusammenarbeit und Anregungen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht:

B. Straubinger, M. Pech, K. Mühlebach, H.R. Jaenichen, H.G. Bauer und H.G. Zachau, Nucl. Acids Res. 12, 5265-5275 (1984)

E. Lötscher, K.H. Grzeschik, H.G. Bauer, H.D. Pohlenz, B. Straubinger und H.G. Zachau, Nature 320, 456-458 (1986)

H.G. Bauer, M. Pech und H.G. Zachau, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. (im Druck)

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung und Problemstellung.....	1
2.	Ergebnisse.....	5
2.1.	Isolierung und erste Charakterisierung von Cosmiden.....	5
2.1.1.	Isolierung von Cosmiden aus Genbanken.....	5
2.1.2.	Erste Analysen von isolierten Cosmiden.....	7
2.1.3.	Cosmid-Isolierungen mit verschiedenen Suchklonen.....	8
2.1.3.1.	Cosmide zur 5'-Extension der Region Chr.22.....	8
2.1.3.2.	Versuch zur 3'-Extension der Region Chr.22....	12
2.1.3.3.	Absuchen von Genbanken mit V_K III-spezifischen Suchklonen.....	13
2.1.4.	Heterogenität der Subgruppe III-Gensegmente...	18
2.1.5.	Effektivität der Cosmid-Isolierungsversuche...	20
2.2.	Restriktionskartierung von Cosmiden.....	22
2.2.1.	Analyse von L-Sequenzen-enthaltenden Cosmiden.	22
2.2.2.	Charakterisierung von Cosmiden der Region Chr.22.....	28
2.3.	Die Region Chr.22.....	31
2.3.1.	Konstruktion von Suchklonen zur Cosmid-Extension.....	33
2.3.2.	Chromosomale Lokalisierung und allelische Situation der Region Chr.22.....	37
2.4.	Sequenzanalyse der Gensegmente der Chr.22-Region.....	40
2.4.1.	Kartierung und Subklonierung der mit V_K -Gensegmenten hybridisierenden Bereiche.....	41
2.4.2.	Sequenzen der V_K -Gensegmente der Region Chr.22.....	45
2.5.	Analyse zur Region Chr.22 teilweise homologer Cosmide.....	52

3.	Diskussion.....	55
3.1.	Strategie zur Kartierung des menschlichen V _K -Locus.....	55
3.2.	Cosmid-Isolierungen aus Genbanken.....	55
3.3.	Ligierungsartefakte bei der Konstruktion von Cosmid-Genbanken.....	57
3.4.	Verstreut im Genom auftretende V _K -Gensegmente.....	58
3.5.	Sequenz-Vergleiche zwischen Gensegmenten der Region Chr.22 und funktionellen V _K -Genen.....	60
3.6.	Pseudogene in Multigenfamilien.....	62
3.7.	Anzahl und Orientierung von V _K -Gensegmenten.....	63
4.	Material und Methoden.....	65
4.1	Materialien.....	65
4.1.1.	Chemikalien und Enzyme.....	65
4.1.2.	Bakterienstämme, Phagen und DNA's.....	66
4.1.3.	Cosmidgenbanken, Cosmide und Hybridisierungs- klone.....	66
4.2.	Methoden.....	67
4.2.1.	Radioaktive Markierung von DNA.....	67
4.2.2.	DNA-Transfer und Hybridisierung.....	67
4.2.3.	In-situ-Hybridisierung von Bakterienkolonien.....	68
4.2.4.	Präparation von DNA.....	69
4.2.5.	Restriktionskartierung.....	70
4.2.6.	Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Frag- menten aus Gelen.....	70
4.2.7.	Klonierung von DNA-Fragmenten in M13-Phagen- DNA und Transfektion.....	71
4.2.8.	Auffüllen Überhängender Enden und Linker- Addition.....	72
4.2.9.	Sequenzierung.....	73
4.2.9.1.	Sequenzierung nach Restriktionskarten.....	73

4.2.9.2.	Test eines neuen Sequenzierungs-Systems.....	73
4.2.10.	Computerprogramme.....	74
4.3.	Biologische Sicherheit.....	74
5.	Zusammenfassung.....	75
6.	Literaturverzeichnis.....	78
7.	Abkürzungen.....	84
	Lebenslauf	

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Das Immunsystem dient höheren Organismen als Schutz gegen in den Körper eingedrungene Fremdstoffe (Antigene). Ein wichtiger Bestandteil dieses Systems sind die von B-Lymphozyten produzierten Antikörper oder Immunglobuline, die Fremdstoffe erkennen und unschädlich machen können. Sie treten membrangebunden als Oberflächenrezeptoren der B-Lymphozyten auf oder werden von Plasmazellen in größeren Mengen sezerniert. Antikörper erkennen Fremdstoffe sehr spezifisch, was bei der großen Zahl bekannter Antigene eine mindestens ebenso große Zahl von Antikörpern, schätzungsweise 10^6 - 10^8 , bedingt (1). Die Vielfalt ergibt sich aus der Struktur der Immunglobuline. Sie bestehen aus zwei identischen leichten Ketten (L-Ketten) und zwei identischen schweren Ketten (H-Ketten), wobei der aminoterminal Bereich der einzelnen Moleküle variabel (V-Region), der carboxyterminale Bereich konstant (C-Region) ist (2,3). Innerhalb der variablen Region gibt es drei kleine Abschnitte, in denen die Aminosäuresequenzen besonders stark variieren (hypervariable Bereiche). Die variablen Bereiche der Antikörper erwiesen sich als die Antigen-Bindungsstellen, wobei die hypervariablen Bereiche hauptsächlich die Spezifität der Antikörper bestimmen.

Ein Einblick in die Struktur der genetischen Information für die Immunglobuline im Genom konnte mit Hilfe molekularbiologischer Methoden gewonnen werden. Für Mensch und Maus konnte gezeigt werden, daß die Immunglobuline von drei Genfamilien codiert werden, die jeweils auf verschiedenen Chromosomen angeordnet sind (4). Zum einen sind dies die Genfamilien für die leichten Ketten des κ - und λ -Typs, die aus drei Gensegmenten zusammengesetzt sind: V_L -, J_L - und C_L -Segmente (5,6). Zum andern die Genfamilie für die schweren Ketten, die aus vier Segmenten aufgebaut

sind: V_H , D, J_H und C_H (5). Durch die verschiedenen C_H -Segmente werden die unterschiedlichen Immunglobulin-Klassen festgelegt (7). Aus diesen Daten ist ersichtlich, daß die einzelnen Ketten der Antikörper nicht durchgehend codiert werden.

Die Zusammenlagerung der getrennt angeordneten Gensegmente erfolgt während der B-Zell-Differenzierung so, daß Gene entstehen, die für funktionelle Immunglobuline codieren können. Dabei werden zuerst die Gensegmente der schweren Kette, dann die der leichten Kette umgelagert (8,9). Durch die Kombination der unterschiedlichen Gensegmente kommt ein großer Teil der Antikörpervielfalt zustande. Eine zusätzliche Möglichkeit, die Vielfalt zu erzeugen, ist durch somatische Mutationen gegeben. Dies sind Punktmutationen, die beim Übergang von der Keimbahn- in die umgelagerte Konfiguration nur in den variablen Regionen auftreten. Auch eine bestimmte Flexibilität an der Verknüpfungsstelle bei der Umlagerung der Gensegmente führt zu einer zusätzlichen Divergenz zwischen den Immunglobulinen (2,4,5). Differenzierte B-Zellen, die zunächst immer IgM produzieren, können auf die Expression anderer Immunglobulin-Klassen umschalten. Durch einen weiteren Umlagerungsvorgang wird dann ein C_H -Segment durch ein anderes ersetzt (7).

Durch die Analyse einer großen Zahl von Immunglobulinen aus Myelomen konnte gezeigt werden, daß die leichten Ketten des κ -Typs 65% der leichten Ketten im Humanserum bilden (10) und, daß sich die V_K -Genfamilie aus mindestens vier Subgruppen (11,12), wahrscheinlich aber mehr (13), zusammensetzt. Zu Untersuchungen über die Struktur und die Genregulation in einer Genfamilie boten sich die V_K -Gene an, da diese Familie im Vergleich zu anderen aus einer relativ geringen Anzahl von Gensegmenten besteht (14). Durch Klonierung des gesamten V_K -Locus könnten folgende Fragen beantwortet werden: Anzahl und Abstand der V_K -Gensegmente, Anordnung der verschiedenen Subgrup-

pen, Orientierung der V_K -Gensegmente zueinander, Anteil der Pseudogene und Divergenz der Gensegmente einer Subgruppe. Aus diesen Daten könnten Aussagen über den Umlagerungs-Mechanismus und die Evolution dieser Genfamilie gemacht werden. Außerdem könnte die Frage, welchen Beitrag somatische Mutationen zur Erzeugung der Antikörpervielfalt beisteuern, beantwortet werden.

Das Ziel der Arbeitsgruppe ist die überlappende Kartierung des menschlichen V_K -Locus in der Keimbahn-Konfiguration und die Analyse charakteristischer Gensegmente durch Sequenzierung. Dazu wurden aus menschlicher Placenta-DNA Genbanken mit Cosmid-Vektoren (15) konstruiert. Diese Vektoren ermöglichen die Klonierung von bis zu 45 kb großen DNA-Fragmenten und sind deswegen zur Kartierung großer Bereiche besser geeignet als andere Systeme. Die Cosmidgenbanken wurden zunächst mit einem V_K -Gensegment der Subgruppe I abgesucht, das mit Hilfe eines Maus- V_K -Gens isoliert worden war (16). Im weiteren Verlauf wurden Suchklone für die übrigen Subgruppen konstruiert (17,18,19) und zur Isolierung und Charakterisierung zahlreicher Cosmide eingesetzt (20,21,22,23,24).

In der vorliegenden Arbeit werden Versuche beschrieben, die kurz nach den ersten Cosmid-Isolierungen in dieser Arbeitsgruppe begannen und die jeweils bestimmte Aspekte des Gesamtprojekts betrafen. Zunächst wurden mehrere Cosmide durch Restriktionsnuklease-Spaltungen charakterisiert. Später konzentrierte sich die Arbeit auf eine Gruppe von Cosmiden, die kürzlich einer auf Chromosom 22 lokalisierten genomischen Region (Region Chr. 22; Ref. 25) zugeordnet wurde. Diese Cosmidklone gehören daher nicht dem auf Chromosom 2 liegenden V_K -Locus an. Im Zusammenhang mit den Analysen an der Region Chr. 22 wurden zahlreiche Cosmide aus Genbanken isoliert und erste Versuche zur Charakterisierung dieser Klone durchgeführt.

Die schriftliche Darstellung folgt aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dem zeitlichen Verlauf der Versuche, sondern beginnt mit der Isolierung und Charakterisierung von Cosmiden. Es folgt die Beschreibung der genomischen Region Chr. 22 und die Arbeit endet mit den bis zu den Nukleotidsequenzen führenden Detailanalysen dieser Region.

2. ERGEBNISSE

2.1. Isolierung und erste Charakterisierung von Cosmiden

Nachdem bereits von anderen Mitarbeitern des Arbeitskreises Cosmide aus Human-Genbanken isoliert und charakterisiert worden waren (16,20), sollten auch in der vorliegenden Arbeit zur Klärung verschiedener Fragestellungen Cosmid-Isolierungen durchgeführt werden.

Mit Hilfe spezifischer Extensions-Suchklone sollten Regionen, die aus mehreren Cosmiden bestehen, vergrößert werden ("chromosomal walking"). Zum einen war dies die Region Chr.22, die Hauptbestandteil dieser Arbeit ist, zum andern die L-Regionen A bzw. B, duplizierte Regionen des V_K -Locus mit insgesamt 14 V_K -Gensegmenten (20,22). Ferner sollten mit verschiedenen V_{KIII} -Suchklonen Cosmide isoliert werden, die Gensegmente dieser Subgruppe enthalten.

2.1.1. Isolierung von Cosmiden aus Genbanken

Die in den folgenden Experimenten verwendeten Genbanken wurden von H.D. Pohlenz (Genbank III) und B. Straubinger (Genbank IV) aus derselben Human-Placenta-DNA konstruiert (26), die auch zur Konstruktion der Genbanken I und II benutzt worden war (4.1.3.). Dadurch ist gewährleistet, daß die Keimbahn-Situation eines einzigen Individuums untersucht wird und die isolierten Cosmide untereinander vergleichbar sind.

Die Bakterien-Koloniezahl, die untersucht werden muß, um ein Gen mit definierter Wahrscheinlichkeit in einer Genbank zu finden, läßt sich berechnen (27). Dabei ist die

Größe der im Vektor inserierten DNA-Fragmente ein Faktor, der die zu untersuchende Kolonienzahl stark beeinflusst. Um im menschlichen Genom ein Gen mit 99% iger Wahrscheinlichkeit zu finden, müssen etwa 300.000 Bakterienkolonien untersucht werden, falls von einer durchschnittlichen Insertgröße von 40 kb ausgegangen wird, wie sie bei Cosmiden üblich ist. In den hier durchgeführten Versuchen wurde jeweils die 2-3 fache Anzahl an Kolonien untersucht (Tabelle 5).

Das Absuchen der Cosmidgenbanken geschah in der folgenden Weise, es wurden Filter-Membranen, die jeweils 5.000 - 10.000 Kolonien trugen, mit radioaktiv-markierter DNA (4.2.1.) der verschiedenen Suchklone hybridisiert (4.2.2.). Nachdem unter nicht-stringenten Bedingungen nachgewaschen worden war, wurden die Filter mit Röntgenfilmen exponiert. Hybridisierende Klone wurden entweder gepickt und direkt angezogen oder, wenn nötig zusätzlich angereichert (4.2.3.). Dieser Schritt ist notwendig, wenn sich das Signal des Autoradiogramms nicht eindeutig einer Einzelkolonie zuordnen läßt. Durch nochmaliges Ausplattieren und Hybridisieren wird gewährleistet, daß immer nur eine Einzelkolonie gepickt wird, die ein Signal gibt. Bei den verschiedenen Experimenten ergab sich, daß sich nach mehrmaliger Verwendung der Genbank-Filter das Verhältnis zwischen Signalen und Hintergrund verbesserte, jedoch die Expositionsdauer länger wurde. Das bedeutet, daß bei den ersten Hybridisierungen die Klon-Auswahl manchmal schwierig war.

Zur Überprüfung und endgültigen Identifizierung der Cosmidklone wurden Einzelkolonien angezogen und DNA isoliert (4.2.4.). Diese wurden, wie in 4.2.5. beschrieben, mit den Restriktionsnukleasen Bam HI und Bgl II gespalten, auf Agarosegelen aufgetrennt (4.2.6.) und auf Filter-Membranen transferiert (4.2.2.). Diese Filter wurden mit den entsprechenden, ^{32}P -markierten Suchklon-DNA's hybridisiert.

2.1.2. Erste Analysen von isolierten Cosmiden

Durch verschiedene Experimente sollten über die isolierten Cosmide Daten gesammelt werden, um die Klone bereits charakterisierten Cosmiden bzw. Regionen (L-Regionen A und B (22), A-Region (24), O-Region und W-Region (23)) zuordnen zu können. Dabei sollten Cosmide, die zur eigenen Weiterbearbeitung und für Projekte anderer Mitglieder der Arbeitsgruppe wichtig waren, charakterisiert werden.

Zur ersten Analyse der isolierten Klone bot sich zunächst an, diese mit Subgruppen-spezifischen Klonen, die von verschiedenen Mitarbeitern isoliert worden waren (Tabelle 1), zu testen. Dadurch wurde ein Überblick über die Anzahl der Gensegmente und die Verteilung der einzelnen Subgruppen auf den Cosmiden erhalten.

Speziell für die Cosmide, die mit V_K^{III} -Suchklonen isoliert wurden, boten sich zur Zuordnung zu bereits charakterisierten Strukturen Hybridisierungstests mit Extensions-Suchklonen ("walking-clone") an. Solche Klone existierten von allen bis dahin im Arbeitskreis charakterisierten Cosmiden bzw. Regionen, die aus überlappenden Cosmiden bestehen. Sie sollten der Erweiterung dieser Strukturen dienen und spezifisch sein, d.h. möglichst in einer oder nur wenigen Kopien im Genom vorkommen. Da auf mehreren Cosmiden bzw. Regionen V_K^{III} -Gensegmente lokalisiert worden waren, sollten deren Extensions-Suchklone zur Zuordnung der isolierten Cosmide herangezogen werden (Tabelle 1).

Eine weitere Möglichkeit der Zuordnung war durch den Vergleich von Fragmenten der isolierten Klone und von bereits charakterisierten Cosmiden, nach Spaltung mit den gleichen Restriktionsnukleasen gegeben. Durch identische Restriktionsfragment-Muster von Cosmidklonen konnten Hinweise auf die Zusammengehörigkeit der Klone erhalten werden.

2.1.3. Cosmid-Isolierungen mit verschiedenen Suchklonen.

Die Region Chr. 22, Hauptgegenstand dieser Arbeit, wird von mehreren Cosmiden repräsentiert und enthält drei V_K -Gensegmente verschiedener Subgruppen. Sie ist deswegen interessant, weil sie auf Chromosom 22 lokalisiert wurde, der Human- V_K -Locus jedoch bisher ausschließlich auf Chromosom 2 festgelegt war (25,28,29).

Ausgehend von vier Überlappenden Cosmiden, cos 16, cos 51, cos 119 und cos 120, die in Abb. 5 gezeigt sind, sollte die Region nach beiden Seiten verlängert werden. Die 5'-Extension sollte durch einen Extensions-Suchklon, die 3'-Extension über einen V_{KIII} -Pseudogen-Klon gefunden werden.

Zusätzliche Isolierungs-Versuche mit V_{KIII} -Suchklonen sollten neben der Chr. 22-Extension auch Cosmide liefern, die die bis dahin bestuntersuchten Regionen des V_K -Locus, die L-Regionen A bzw. B, verlängern. Zu diesem Zweck wurde auch ein für diese Regionen spezifischer Extensions-Suchklon eingesetzt. Diese Experimente sollten darüberhinaus Cosmide mit bisher nicht isolierten V_{KIII} -Gensegmenten liefern.

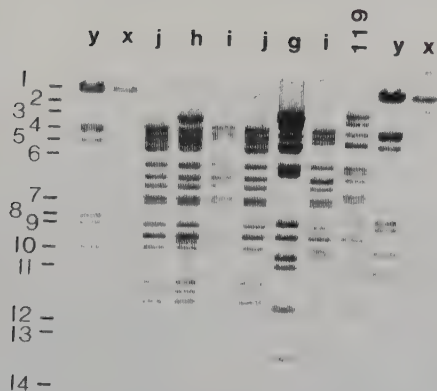
2.1.3.1. Cosmide zur 5'-Extension der Region Chr.22

Als 5'-Extensions-Suchklon diente m 119-2 (Abb. 5), ein 1.3 kb Bam HI- Xho I- Fragment aus cos 119, das in M13-Phagen-DNA kloniert war (2.3.1.). Mit Hilfe dieses Klons konnten durch zwei Hybridisierungs-Experimente mit Genbank III und IV neun bzw. sechs Cosmide isoliert werden. Nach Doppelspaltungen mit den Restriktionsnukleasen Bam HI und Bgl II und anschließender elektrophoretischer Auftrennung der Spaltprodukte der neun Cosmide aus

Genbank III ergab sich durch Restriktionsfragment-Ver-
gleich, daß einige der isolierten Cosmide untereinander
identisch waren, und daß alle mit dem Ausgangscosmid
stark überlappten (Abb. 1).



A



B

Abb. 1

Abb. 1: Restriktionsfragment-Analyse von Cosmiden, die mit Hilfe eines Extensions-Suchklons aus Region Chr. 22 isoliert wurden.

Die DNA der isolierten Cosmide wurde nach Doppelspaltung mit den Restriktionsnukleasen Bam HI und Bgl II auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und mit dem Ausgangs-cosmid cos 119 (Abb. 5) verglichen. Als Marker zur Bestimmung der Fragmentgrößen diente λ -Phagen-DNA, die mit den Nukleasen Hind III (x) bzw. Hind III / Eco RI (y) gespalten wurde. Die Marker-Fragmentgrößen sind (30): 1 = 23 kb; 2 = 9,4 kb; 3 = 6,6 kb; 4 = 5,0; 5,1 kb; 5 = 4,3 kb; 6 = 3,5 kb; 7 = 2,3 kb; 8 = 2,0 kb; 9 = 1,9 kb; 10 = 1,6 kb; 11 = 1,3 kb; 12 = 1,0 kb; 13 = 0,8 kb; 14 = 0,6 kb.

Bild A zeigt aus Genbank III isolierte Cosmide, die mit cos 119 stark überlappen. Sie extendieren nur ungefähr 10 kb (cos 121, f), und liegen enggestaffelt beieinander. Cosmide, die identisch sind, erhielten die gleichen Buchstaben. Cos 121 wurde anschließend genauer analysiert (2.2.2.). a, cos 126; b, cos 124; c, cos 125; d, cos 115; e, cos 122; f, cos 121.

In Bild B sind aus Genbank IV isolierte Cosmide abgebildet, sie sind größtenteils stark verschieden von cos 119 und extendieren deswegen sehr stark. Cos 508 (g) überlappt als einziges Cosmid dieser Serie sehr stark mit cos 119. Auch hier erhielten identische Cosmide die gleichen Buchstaben. Aus dieser Serie wurde cos 650 genauer analysiert (2.2.2.). g, cos 508; h, cos 651; i, cos 652; j, cos 650.

Alle Cosmide sind in Abb. 7 dargestellt.

Um die größtmögliche Extension in diese Richtung zu erhalten, wurde ein weiterer Cosmidisolierungs-Versuch mit Genbank IV durchgeführt. Zur Konstruktion dieser Genbank war die Placenta-DNA mit anderen Restriktionsnukleasen gespalten worden, um zu Genbank III unterschiedliche Fragmente klonieren zu können (4.1.3.). Es gelang, sechs weitere Cosmide zu isolieren, die wie zuvor analysiert wurden. Diese Isolate unterschieden sich, mit Ausnahme eines Cosmids, sehr stark vom Ausgangscosmid cos 119 und waren untereinander sehr ähnlich. Diese Klone extendierten die ursprüngliche Situation stark (Abb. 1).

Durch Tests mit den in Tabelle 1 aufgeführten Klonen für die verschiedenen V_K -Subgruppen, konnte gezeigt werden, daß die isolierten Cosmide keine zusätzlichen V_K -Genseg-

mente enthalten. Zur genaueren Charakterisierung wurde von jeder Cosmidgruppe das zum Ausgangsklon unterschiedlichste Cosmid (cos 121, cos 650) herangezogen.

Tabelle 1: Übersicht über die Subklone, die zur Charakterisierung isolierter Cosmide verwendet wurden.

Subklone	Spezifität
m 1-3	V _K I-Gensegment (Signalsequenz, Intron, codierende Region) (16)
m 607V-3	V _K II-Gensegment (codierende Region) (17)
m 21-4	V _K III-Gensegment (Signalsequenz, Intron) (21)
m 41V-7	V _K III-Gensegment (codierende Region) (18)
m 41UL-3	5'-Flanke eines V _K III-Gensegments (18)
m 120-10	V _K III-Pseudogensegment (diese Arbeit, Abb. 9b)
m 21-1	L-Regionen A und B (22)
m 105-1	L-Regionen A und B (31)
m 108-1	Cosmid 108 (32)
m 109-1	Cosmid 109 (32)
m 120-11	Region Chr. 22 (diese Arbeit, Abb. 9b)
m 120-12	Region Chr. 22 (diese Arbeit, Abb. 9b)
m 142-1	A-Region (24)
m 143-1	O-Region (23)

Die aufgeführten Subklone sind M13-Phagen-Klone, die für die einzelnen V_K-Subgruppen oder für bestimmte Regionen bzw. Cosmide spezifisch sind. A-, O- und L-Regionen sind Bereiche des V_K-Locus, die mehrere Gensegmente enthalten.

2.1.3.2. Versuch zur 3'-Extension der Region Chr.22

Die 3'-Extension sollte durch den V_K III-Pseudogen-Klon m 120-10 (Abb.9b), aus Cosmid cos 120 gefunden werden. Dazu wurde ein 1.1 kb Hpa II- Sst I- Fragment, das das V_K III-Pseudogen und dessen Flanken enthielt, in M13-DNA kloniert. Außerdem war aufgrund von Hybridisierungstests (2.1.4.) erwartet worden, mit diesem Suchklon stark divergente Subgruppe III-Gensegmente zu finden.

Durch diesen Versuch gelang die Isolierung von 13 Cosmiden, die sowohl mit den Subgruppen-spezifischen Klonen, als auch mit den Extensions-Suchklonen, die in Tabelle 1 gezeigt sind, analysiert wurden. Die Cosmid-DNA gab mit keinem der eingesetzten Suchklone ein Signal, außer mit dem Pseudogen-Suchklon selbst. Wichtig ist, daß selbst die Flankenklone, m 120-11 und m 120-12 (Abb.9b), des V_K III-Pseudogen-Segments kein Signal gaben. Dies und die später beschriebenen Sequenzdaten (2.4.2.) deuten darauf hin, daß es sich hier nicht um isolierte V_K -Gensegmente handelt. Die Sequenzdaten zeigen, daß das V_K III-Gensegment am 3'-Ende unvollständig ist und von einer Thyminreichen Sequenz flankiert wird. Es ist zu vermuten, daß die Cosmidgruppe durch diese Sequenz, die möglicherweise repetitiven Charakter hat, isoliert wurde.

Auch ein zweiter Ansatz zur 3'-Extension der Region Chr. 22 war nicht erfolgreich. Gemeinsam mit M. Pech wurden Genbanken mit zwei Klonen abgesucht: mit einem V_K III-spezifischen Suchklon zur Extension der Region Chr.22 und mit einem L-Region-spezifischen Suchklon zur Extension der von M. Pech bearbeiteten L-Regionen A und B (20,22).

Der V_K III-spezifische Suchklon m 21-4 bestand aus einem Fragment, das die Signalsequenz sowie das Intron eines V_K III-Gensegments aus der L-Region A umfaßte (Tabelle 1). Er sollte zur Erweiterung der Chr.22-Region und der

L-Regionen dienen. Dieser Versuch brachte jedoch kein zählbares Ergebnis, da keine deutlich positiven Signale gegenüber dem unspezifischen Hintergrund auftraten.

Aus zwei Hybridisierungs-Experimenten mit zwei unterschiedlichen Genbanken (4.1.3.) wurden mit m 21-1, dem L-Region-spezifischen Suchklon (Tabelle 1), insgesamt sieben Cosmide isoliert. Nach genauer Charakterisierung durch E. Huber (33) erwiesen sie sich zum Teil als identisch mit Isolaten aus Versuchen mit V_K^{III} -Suchklonen (2.1.3.4.). Zwei dieser Cosmide extendieren die L-Region B, die übrigen fallen in Bereiche, die bereits charakterisiert wurden. Da durch diese Experimente die gewünschte 3'-Extension der Region Chr.22 nicht gefunden wurde, sollte die Suche mit V_K^{III} -spezifischen Klonen fortgesetzt werden.

2.1.3.3. Absuchen von Genbanken mit V_K^{III} -spezifischen Suchklonen

Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Experimente sollten hauptsächlich zur Extension der Chr.22-Region, außerdem aber zur Erweiterung anderer bereits charakterisierter Regionen des V_K -Locus (L-Regionen A, B (22), A-Region (24), O-Region und W-Region (23)) dienen. Weiterhin sollten durch diese Versuche die V_K -Gensegmente der Subgruppe III möglichst vollständig isoliert werden.

Es wurden zwei unterschiedliche Suchklone in getrennten Experimenten eingesetzt, da aufgrund von Aminosäure-Sequenzen Hinweise auf eine Heterogenität innerhalb dieser Subgruppe existierten (34). Dies war einmal der im vorigen Abschnitt beschriebene Suchklon m 21-4, der sich in Vorversuchen von M. Pech als spezifisch für die bis dahin bekannten V_K^{III} -Gensegmente erwiesen hatte und nochmals zu Isolierungs-Experimenten herangezogen wurde.

Zum andern wurde der V_{KIII} -Genklon m 41V-7 benutzt, der nur den codierenden Bereich eines umgelagerten V_K -Gen-segments umfaßt (Tabelle 1).

Die mit diesen Klonen isolierten Cosmide wurden mit den in Tabelle 1 beschriebenen Klonen getestet und in einigen Fällen durch Restriktionsfragment-Vergleiche zugeordnet. Die Klone wurden in zwei Gruppen zusammengefaßt, die durch die für die Isolierung verwendeten Suchklone bestimmt wurden.

Tabelle 2 zeigt das Ergebnis für Cosmide, die mit dem Suchklon m 21-4 isoliert wurden. Die Klone enthalten ausnahmslos mehrere Gensegmente unterschiedlicher Subgruppen. Zwei Cosmide konnten mit Hilfe der entsprechenden Extensions-Suchklone der Region Chr.22 zugeteilt werden. Der größte Teil dieser Klone gehörte den L-Regionen A oder B an. Der Cosmidklon 657 wurde aufgrund eines charakteristisch mit Subgruppe I-Proben hybridisierenden Pst I- Fragments zugeordnet. Für die Cosmide 501 und 656 war die Zuordnung zu den in Tabelle 2 angegebenen Regionen erst nach Restriktionskartierung möglich.

Die Ergebnisse für Klone, die mit dem V_{KIII} -Genklon m 41V-7 isoliert wurden, sind in Tabelle 3 dargestellt. Auch hier sind, mit Ausnahme von cos 138, mehrere V_K -Gen-segmente auf den Cosmiden verteilt. Die Zuordnung aufgrund der Hybridisierungsdaten war nur für die zu den L-Regionen gehörenden Klone möglich. Durch Fragmentvergleiche nach Spaltungen der DNA aller isolierten Cosmide und von Klonen bereits charakterisierter Regionen mit den Restriktionsnukleasen Bam HI und Bgl II konnte der Cosmidklon cos 140 der W-Region (23) zugeordnet werden. Für die Übrigen Cosmide war dies nur nach anschließender Restriktionskartierung möglich.

Tabelle 2: Übersicht über die Analyse der Cosmide, die mit dem V_{KIII} -Klon m 21-4 isoliert wurden.

Cosmide		Zuordnung
cos 500	+	Region Chr. 22
cos 501	+	L-Region A (35)
cos 502	+	L-Region A
cos 503	+	L-Region B
cos 504	+	L-Region B
cos 505	+	L-Region A
cos 653	+	Region Chr. 22
cos 655	+	L-Region A
cos 656	-	A-Region (36)
cos 657	+	W-Region
m 1-3	+	
m 607V-3	+	
m 41V-7	+	
m 21-4	+	
m 41UL-3	-	
m 21-1	-	
m 105-1	-	
m 108-1	-	
m 109-1	-	
m 120-11	+	
m 120-12	-	
m 142-1	+	
m 143-1	-	

Tabelle 2: Filter mit DNA aller aufgeführten Cosmide wurden mit den jeweils angegebenen Suchklonen hybridisiert und soweit möglich bekannten Regionen oder Cosmiden zugeordnet. Die verschiedenen Subgruppen-spezifischen Proben und die Suchklone sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Da die Suchklone m 41UL-3 und m 142-1 nicht vollständig spezifische Signale gaben, kommt diesen Ergebnissen wenig Bedeutung zu. A-, L- und W-Regionen sind Bereiche des V_K -Locus mit jeweils mehreren Gensegmenten.

Mit dem Subgruppe III-Suchklon m 21-4 (Tabelle I) konnten sechs weitere Cosmide isoliert werden, die auch bei einem Cosmidisolierungs-Versuch mit einem Subgruppe II-Klon identische Signale ergaben (cos 506, cos 507, cos 654, cos 658, cos 659, cos 660). Diese Klone wurden teilweise bei den beschriebenen Experimenten mitgetestet, werden aber in einer anderen Dissertation beschrieben (23).

Tabelle 3: Die Zuordnung dieser Gruppe durch Hybridisierungsdaten war für den größten Teil der L-Region-positiven Klone möglich. Cos 140 wurde durch Restriktionsfragment-Vergleiche zugeordnet. Die übrigen Klone konnten nur nach Kartierung den entsprechenden Regionen zugeteilt werden. Die Ergebnisse mit dem Klon m 41UL-3 sind wegen dessen unvollständiger Spezifität nicht verwertbar. Cosmide mit pJB 8-Vektoren sind durch (*) gekennzeichnet.

Tabelle 3: Zuordnung der Cosmide, die mit einem V_K III-Genklon isoliert wurden.

Cosmide		Zuordnung
cos 129	m 143-1	L-Region A (35)
cos 130	m 142-1	A-Region (35)
cos 131	m 120-12 m 120-11	A-Region (35)
cos 132	m 109-1	L-Region A
cos 133	m 108-1	L-Region B (35)
cos 134	m 105-1	L-Region B
cos 135	m 41UL-3	L-Region B
cos 136*	m 21-4 m 41V-7	L-Region B
cos 137*	m 607V-3	L-Region A
cos 138*	m 1-3	offen
cos 139		A-Region (35)
cos 140		W-Region

2.1.4. Heterogenität der Subgruppe III-Gensegmente

Wie zuvor erwähnt (2.1.3.3.), sind die Proteine der Subgruppe III heterogen und werden in Sub-Subgruppen eingeteilt (34). Auf DNA-Ebene konnte durch Gesamt-DNA-Hybridisierung mit einem V_K -Gensegment der Subgruppe III gezeigt werden, daß unter nicht-stringenten Bedingungen Kreuzhybridisierung zwischen Gensegmenten der Subgruppen I und III auftritt. Neben zusätzlichen Banden waren auch die Banden zu sehen, die mit einem Subgruppe I-Klon ein Signal gaben. Unter stringenten Bedingungen erschienen mit einem V_K III-Genklon in Gesamt-DNA nur wenige Banden, die sicher nicht das gesamte Repertoire der V_K III-Gensegmente darstellen (18). Dadurch ergeben sich Hinweise für eine Heterogenität der Gensegmente dieser Subgruppe. Aus diesem Grund waren zur Isolierung der V_K III-Gensegmente verschiedene Suchklone (2.1.3.4.) eingesetzt worden.

Die Kreuzhybridisierungs-Eigenschaften der verwendeten V_K III-Klone untereinander wurden durch einen Hybridisierungsvergleich untersucht. Die in M13-Phagen klonierten DNA-Fragmente wurden mit den entsprechenden Nukleasen aus der Phagen-DNA gespalten, auf Agarosegelen aufgetrennt und die DNA auf Filter transferiert. Die Filter wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Genbankfilter mit den ligierten, ^{32}P -markierten DNA-Fragmenten der Subklone hybridisiert (4.2.2.). Das Ergebnis zeigt Tabelle 4. Die Subklone aus funktionellen Genen (m 21-4 und m 41V-7) kreuzhybridisieren miteinander, die Pseudogen-DNA (m120-10; Abb. 9b) ergibt nur mit dem Suchklon m 21-4, der Signalsequenz und Intron umfaßt, ein schwaches Signal. Dadurch lassen sich die Ergebnisse der Cosmid-Isolierungen mit den verschiedenen V_K III-Suchklonen erklären. Mit Klonen der funktionellen Gensegmente war eine Reihe vom Cosmiden isoliert worden (2.1.3.3.), die bereits charak-

terisierten Bereichen zugeordnet werden konnten. Mit dem Pseudogen-Klon dagegen konnten keine Cosmide gefunden werden, die V_K -Gensegmente enthalten (2.1.3.2.).

Tabelle 4: Hybridisierungsvergleich dreier V_K -Gen-segmente.

immobilisierte Klone	radioaktive Hybridisierungs- Klone		
	m 21-4	m 41V-7	m 120-10
m 21-4 (Tab. 1)	+ +	+	(+)
m 41V-7 (Tab. 1)	+ +	+ +	-
m 120-10 (Abb. 9b)	(+)	-	+ +

Symbole: + + starkes Signal
+ positives Signal
(+) schwaches Signal
- kein Signal

Die aufgeführten M13-Klone wurden mit den daraus isolierten, ligierten und ^{32}P -markierten DNA-Fragmenten hybridisiert. Die Versuchs-Bedingungen entsprachen denen der Genbank-Experimente (4.2.2.). Die Diskrepanz zwischen den Signalstärken bei den Experimenten mit den Klonen m 21-4 und m41V-7 kann durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen beim Transfer der DNA auf die Filter oder bei der Fixierung der DNA an die Filter erklärt werden. Dadurch kann die Bindung der Probe und damit die Signalstärke beeinträchtigt werden.

2.1.5. Effektivität der Cosmid-Isolierungsversuche

Im Abschnitt 2.1.1. wurde erwähnt, daß Kolonien, die bei Genbank-Hybridisierungen ein Signal gaben, teilweise angereichert werden mußten und nach DNA-Isolierung zur endgültigen Identifizierung nochmals mit der Suchklon-DNA hybridisiert wurden. Dabei konnte oft festgestellt werden, daß zuvor hybridisierende Klone in der Anreicherung oder nach DNA-Isolierung kein Signal zeigten. Bei den beschriebenen Isolierungs-Versuchen war der Anteil solcher artifizieller Signale von Experiment zu Experiment verschieden, wie aus Tabelle 5 zu entnehmen ist. Bei Isolierungs-Versuchen mit V_{KIII} -Subklonen wurden aufgrund der Kenntnis der Heterogenität dieser Subgruppe auch schwache Signale untersucht, so daß die Diskrepanz zwischen Signal-Zahl und Cosmid-Zahl erklärt werden kann.

Tabelle 5: Ergebnisse der Cosmid-Isolierungen aus zwei Genbanken mit verschiedenen Klonen.

	Suchklon	Signale	Cosmide
a) Genbank III	m 119-2	21	9
	m 21-1	5	3
	m 41V-7	38	13
b) Genbank IV	m 119-2	10	6
	m 21-1	11	4
	m 21-4	35	16
	m 120-10	16	13

Tabelle 5: Die beiden Genbanken (4.1.3.) waren mit den verschiedenen Klonen abgesucht worden, um extendierende Cosmidklone zu charakterisierten Regionen bzw. Cosmiden, die Subgruppe III-Gensegmente enthielten, zu isolieren. Mit den Extensions-Suchklonen m 119-2 und m 21-1 wurden beide Genbanken abgesucht. Die Genbank III umfaßte etwa 110 Filter, die Genbank IV etwa 60 Filter mit je 5000 - 10000 Bakterienkolonien. Bei den einzelnen Cosmid-Isolierungsversuchen wurden im ersten Fall ca. 10⁶ Kolonien untersucht, im zweiten Fall ungefähr die Hälfte davon. Das bedeutet, daß jeweils die 2 - 3 fache Anzahl der nötigen Kolonien getestet wurde (siehe 2.1.).

Die in Abschnitt 2.1.3.2. beschriebenen, erfolglosen Versuche mit dem V_KIII-Suchklon m 21-4 und dem L-Region-spezifischen Klon, sowie das Ergebnis mit dem Extensions-Suchklon m 119-2 in Genbank III (Tabelle 5) lassen sich durch die Verwendung von Dextran-Sulfat bei der Hybridisierung erklären. Dextran-Sulfat dient zur Verstärkung der Hybridisierungs-Signale; wenn jedoch zu hohe Probenkonzentrationen eingesetzt werden, wird der Hintergrund drastisch erhöht. Dadurch wird die Identifizierung hybridisierender Klone erschwert oder unmöglich gemacht (siehe 2.1.3.3.).

Eine weitere Ursache für artifizielle Signale sind eng aneinanderliegende Bakterienkolonien, die durch den verstärkten Hintergrund ein Signal vortäuschen. Aufgrund der genannten Fehlerquellen war eine Kontrolle der isolierten Cosmid-DNA's unumgänglich.

2.2. Restriktionskartierung von Cosmiden

Im ersten Teil des folgenden Abschnitts wird auf die Analyse von Cosmiden eingegangen, die aus den Genbanken I und II isoliert wurden. Diese Cosmidklone enthalten Sequenzen einer neuen Familie (L-Sequenzen), die Bestandteil der 3'-Flanken einer Gruppe menschlicher $V_K I$ -Gensegmente sind oder isoliert im Genom vorkommen können (37). Im zweiten Teil wird die Charakterisierung der im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen, die Chr. 22-Region extendierenden Cosmide beschrieben.

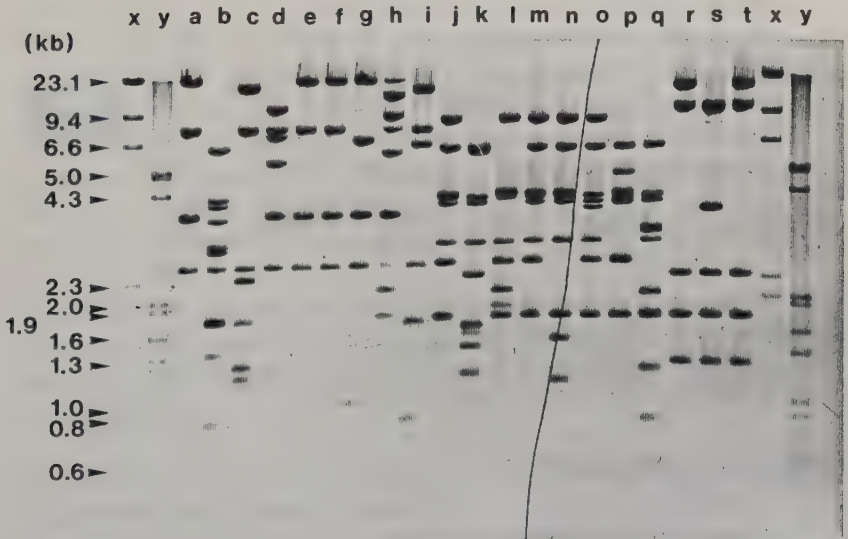
2.2.1. Analyse von L-Sequenzen-enthaltenden Cosmiden.

Von M. Pech waren aus den Human-Genbanken I und II (4.1.3.) mit Hilfe eines $V_K I$ -Suchklons 28 verschiedene Cosmidklone isoliert worden (16). Diese wurden von mehreren Mitarbeitern des Arbeitskreises charakterisiert (20,24,38,39,40, vorliegende Arbeit).

Zur Restriktionskartierung von Cosmiden waren Restriktionsnukleasen ausgewählt worden, bei denen zur Kartierung geeignete Fragmentgrößen zu erwarten waren. Dies wurde durch Nukleasen erreicht, die die Nukleotidfolge CpG in ihrer Erkennungssequenz enthalten, und deswegen in eukaryontischer DNA relativ selten spalten. Die folgenden Enzyme wurden verwendet: Cla I, Nru I, Pvu I, Sac II, Sal I, Sma I, Xho I. Dazu Bgl II, Bam HI und Kpn I, wobei die drei letztgenannten Nukleasen keine CpG-Nukleotidsequenz erkennen und daher häufiger spalten. Alle in der Arbeitsgruppe charakterisierten Klone wurden mit den oben genannten Nukleasen kartiert, um die einzelnen Karten vergleichen zu können.

Bakterien, die rekombinante DNA enthielten, wurden ange-
zogen und Cosmid-DNA isoliert, wie in 4.2.4. beschrieben.
Zur Kartierung wurde die DNA mit den verschiedenen
Restriktionsnukleasen durch Einzel- und Doppelspaltungen
gespalten (4.2.5.), die Spaltprodukte über Agarosegele
aufgetrennt (4.2.6.) und die DNA auf Filter transferiert.

Mit aufgetragene, gespaltene DNA des Phagen λ machte es
möglich, durch die Laufstrecke der bekannten Markerfrag-
mente in Agarosegelen, Eichgeraden auf halblogarithmi-
schem Papier zu erstellen. Mit Hilfe dieser Eichgeraden
konnten alle Fragmentgrößen aufgrund ihrer Laufstrecke
bestimmt werden. Ein Beispiel für eine elektrophoreti-
sche Auftrennung von DNA-Spaltprodukten auf einem
Agarosegel zeigt Abb. 2.



A

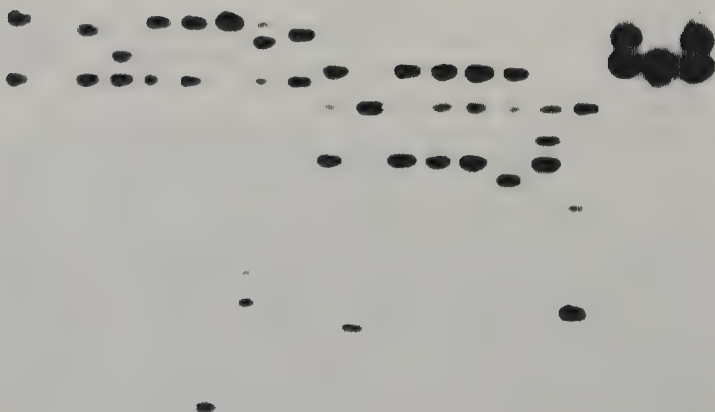
Abb. 2

a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t



B

a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t



C

Abb. 2: Restriktionskartierung des Cosmids cos 56

Bild A: Photographie eines 0,8%igen Agarosegels, das mit Ethidiumbromid angefärbt und im UV-Durchlicht photographiert wurde. Solche Gele dienten zur Auftrennung der DNA-Spaltprodukte bei Cosmid-Kartierungen.

In a-t sind die Einzel- bzw. Doppelspaltungen von cos 56-DNA abgebildet: a, Bam HI; b, Bam HI/Bgl II; c, Bam HI/Nru I; d, Bam HI/Pvu I; e, Bam HI/Cla I; f, Bam HI/Sal I; g, Bam HI/Xho I; h, Bam HI/Kpn I; i, Bam HI/Sma I; j, Bgl II; k, Bgl II/Nru I; l, Bgl II/Pvu I; m, Bgl II/Cla I; n, Bgl II/Sal I; o, Bgl II/Xho I; p, Bgl II/Kpn I; q, Bgl II/Sma I; r, Nru I; s, Nru I/Pvu I und t, Nru I/Cla I. Als Marker diente λ -DNA, die mit Hind III (x) und Hind III/Eco RI (y) gespalten war.

Bild B zeigt das zum obigen Agarosegel gehörende Autoradiogramm der Hybridisierung der cos 56-Spaltungen mit dem Subgruppe I-Subklon m 1-1 (16).

Bild C zeigt das Autoradiogramm der Hybridisierung des gleichen Filters mit ^{32}P -markierter Human-Placenta-DNA.

Zur Genlokalisierung wurden die Kartierungsfilter mit dem V_K I-Subklon m 1-1 hybridisiert (16), die Information aus diesen Experimenten war oft bei den Kartierungen von Nutzen. Zur Lokalisierung repetitiver Sequenzen auf den Cosmiden wurden die Filter mit radioaktiv-markierter Human-Placenta-DNA hybridisiert. Mit dieser Methode sind repetitive Sequenzen zu erkennen, die in mehreren 100 Kopien im Genom vorkommen. Die Abb. 2 zeigt je ein Autoradiogramm als Beispiel.

Aus den Ergebnissen der Mehrfachspaltungen und den Hybridisierungsdaten war es möglich, die Restriktionskarten der vier Cosmidklone, die in Abb. 3 dargestellt sind, zu erstellen.

Im folgenden soll auf Probleme bei der Kartierung und auf Besonderheiten dieser Cosmidgruppe eingegangen werden. Spaltstellen waren immer dann nicht eindeutig zu lokalisieren, wenn sie nur von Spaltstellen des gleichen Enzyms umgeben waren. Beispiele dafür sind die mit "b" gekennzeichneten Spaltstellen. Bei cos 27 und 53 sind jeweils zwei Positionen zur Lokalisierung der Sma I- bzw. Bgl II-

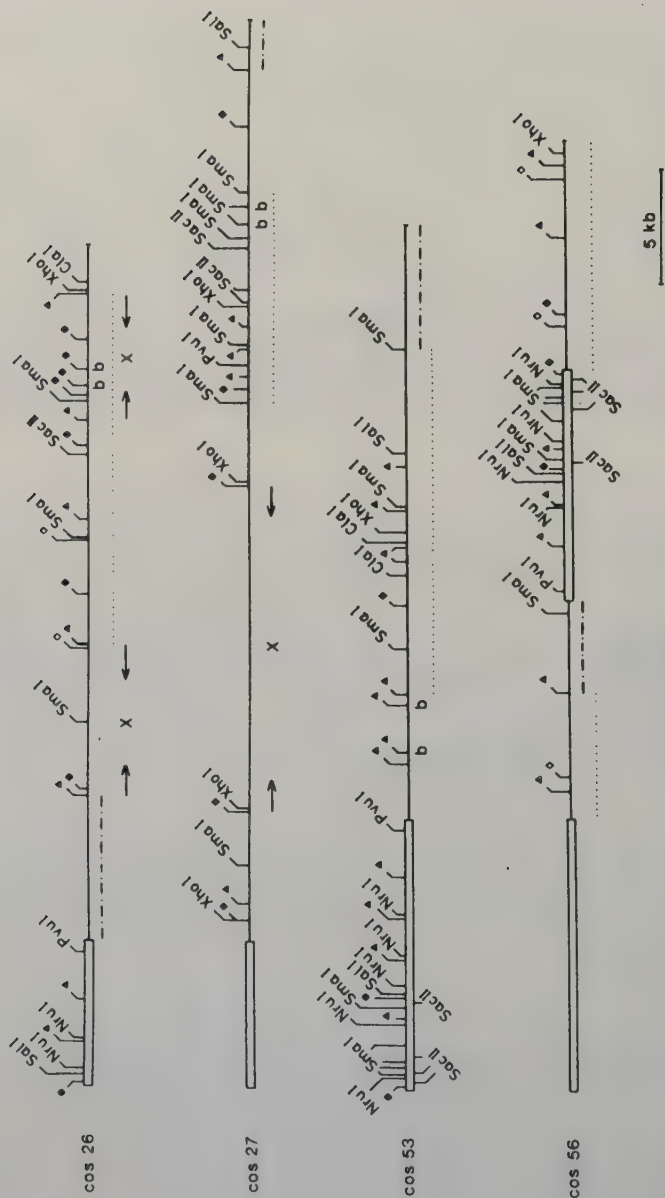


Abb. 3

Abb. 3: Restriktionskarten der Cosmide cos 26, cos 27, cos 53 und cos 56.

Dargestellt sind die Restriktionskarten von vier Cosmiden, die L-Sequenzen enthalten, und aus den Genbanken I und II stammen. Die zur Konstruktion der Genbanken eingesetzten Vektoren sind als offene Balken dargestellt. Die mit dem Subgruppe I-Klon m 1-1 (16) hybridisierenden Bereiche sind durch Striche und Punkte; Bereiche mit repetitiven Sequenzen sind durch Punktierung gekennzeichnet. Die in cos 27 und cos 53 mit "b" markierten Spaltstellen können eine von beiden möglichen Positionen einnehmen. Für die in cos 26 mit "b" markierten Spaltstellen sind mehrere Anordnungen möglich, von denen eine dargestellt ist. Innerhalb der durch Pfeile und ein "X" markierten Bgl II-Fragmente von cos 26 konnten je zwei Bgl II-Spaltstellen und im ebenso gekennzeichneten Bam HI Fragment von cos 27 konnten Bgl II-, Sal I- und Sma I-Spaltstellen nicht kartiert werden. Folgende häufig spaltende Enzyme sind durch Symbole ersetzt: Bam HI (◆), Bgl II (▲) und Kpn I (◇). Dies wurde auch in den folgenden Abbildungen beibehalten.

Spaltstelle möglich, während bei cos 26 mehrere Möglichkeiten bestehen, die beiden Bam HI-Spaltstellen zu kartieren. Im letzten Fall ist in Abb. 3 nur eine Möglichkeit dargestellt. In den durch Pfeile und ein X gekennzeichneten Bereichen von cos 26 und 27 konnten Bgl II- bzw. Bgl II-, Sal I- und Sma I-Spaltstellen nicht kartiert werden, da durch die begrenzenden Stellen keine weitere Zuordnung möglich war (cos 27) oder die für die Kartierung nötigen benachbarten Stellen nicht sicher festzulegen waren (cos 26).

Cos 56 zeigt einen Mangel, der vielen Cosmiden aus den Genbanken I und II anhaftet: Das Cosmid enthält zwei Vektor-Kopien und zwei inserierte DNA-Fragmente. Dieser Mangel ist auf unvollständige Phosphatase-Behandlung der Vektoren und unzureichende Größenfraktionierung der zu klonierenden DNA-Fragmente zurückzuführen (16). Die vier Cosmide enthalten große Bereiche repetitiver DNA und hybridisieren mit dem Subgruppe I-Klon, m 1-1, der auch die flankierenden Bereiche der Gensegmente umfaßt. Durch Untersuchungen von B. Straubinger konnte eine neue repe-

titive Sequenzfamilie, die L-Sequenzen, beschrieben werden (37). Diese Sequenzen wurden sowohl in den 3'-Flankenregionen einer Gruppe von V_K I-Gensegmenten, als auch getrennt von Gensegmenten im Genom gefunden. Die Kopiezahl dieser Sequenzen wurde auf etwa 10^2 geschätzt. Die hier beschriebenen Cosmidklone wurden teilweise genauer analysiert (37) und gehören zur zweiten Gruppe, d.h. sie enthalten kein V_K -Gensegment, sondern nur isolierte L-Sequenzen. Deswegen wurde die Analyse dieser Cosmide in der vorliegenden Arbeit nicht über das beschriebene Ausmaß hinaus weiterbetrieben.

2.2.2. Charakterisierung von Cosmiden der Region Chr. 22

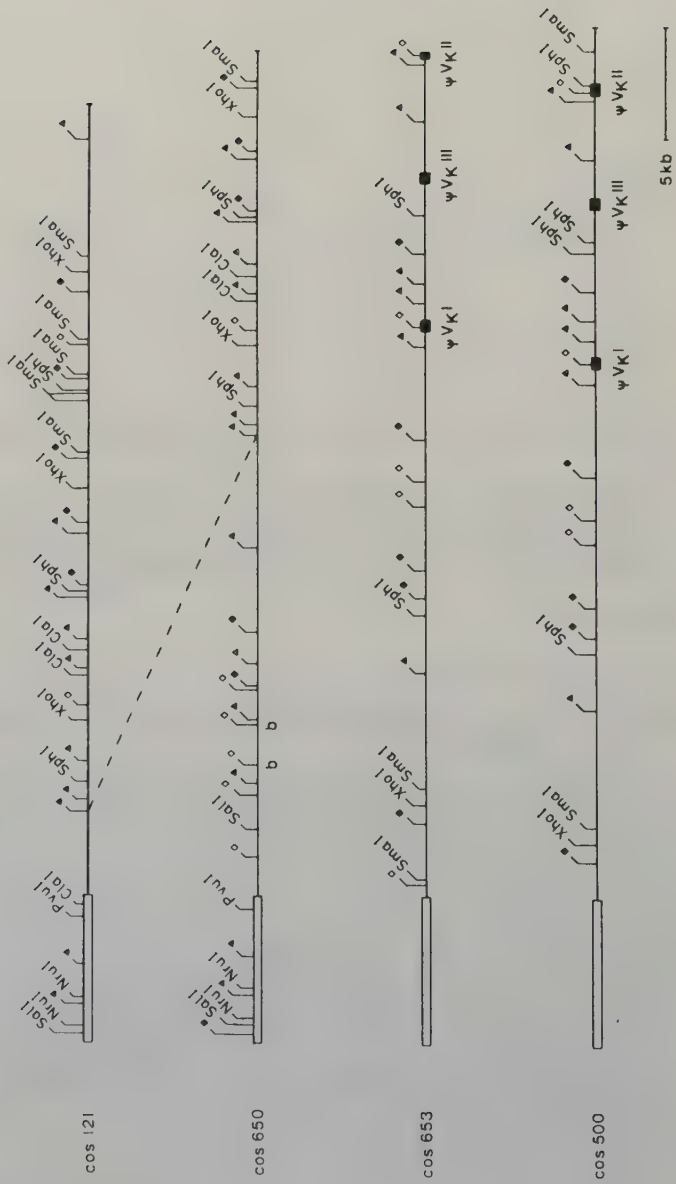
Durch die in Abschnitt 2.1. beschriebenen Cosmidisolierungs-Experimente konnten verschiedene Klone gefunden werden, die die Region Chr. 22 (2.3.) nach beiden Seiten erweitern sollten.

Zur 5'-Extension wurde mit Hilfe eines spezifischen Suchklons eine ganze Reihe von Cosmiden isoliert. Die beiden zum Ausgangscosmid cos 119 unterschiedlichsten Cosmide wurden mit der gleichen Methode wie zuvor beschrieben kartiert. Aus den Restriktionsfragment-Vergleichen war bereits klar, daß cos 650 die ursprüngliche Situation der analysierten Region am weitesten verlängern würde (Abb. 1). Außerdem waren auf den Cosmiden dieser Gruppe durch Hybridisierung mit spezifischen Klonen für die verschiedenen Subgruppen keine V_K -Gensegmente nachzuweisen. Die Restriktionskarten von cos 121 und cos 650 zeigt Abb. 4. Wie erwartet überlappen die beiden Cosmide zur Hälfte. Dieser Umstand erleichterte auch die Kartierung, da der schwierig zu kartierende Mittelbereich von cos 650 durch die Karte von cos 121 sicher festgelegt werden konnte. Durch cos 650 konnte die Region Chr. 22 um 30 kb verlängert werden.

Die 3'-Extension dieser Region sollte durch die Isolierungsversuche mit Subgruppe III-Suchklonen gefunden und durch Hybridisierung mit Flankenklonen des V_K III-Pseudogens aus cos 120 bestätigt werden (Tabelle 2). Auf diese Art wurden zwei Cosmidklone (cos 500 und cos 653) identifiziert, die ebenfalls kartiert wurden. Da die Ausgangs-cosmide cos 119 und cos 120 zusätzlich mit der Nuklease Sph I kartiert worden waren, sollten auch diese Cosmide durch Sph I-Spaltungen analysiert werden. Die Restriktionskarten dieser Cosmide sind ebenfalls in Abb. 4 dargestellt. Diese Klone erwiesen sich als untereinander stark überlappend und sie fallen in die Region Chr. 22, ohne diese zu extendieren. Durch Hybridisierung mit entsprechenden Subklonen konnten die V_K -Gensegmente der Subgruppen I, II und III auf beiden Cosmiden gefunden werden. Bezüglich der Sph I-Spaltstellen unterscheiden sich diese Klone, wie auch andere Cosmide dieser Region, in einer Stelle, die in der Nähe des V_K III-Pseudogens liegt (Abb. 4). Darauf wird in Abschnitt 2.3.2. genauer eingegangen.

Abb. 4: Restriktionskarten von Cosmiden der Region Chr. 22.

Die Abbildung zeigt vier Cosmide der Region Chr. 22. Cos 121 und cos 650 sind überlappende Klone, die die 5'-Extension dieser Region darstellen. Die beiden anderen Cosmide sind fast identisch und liegen in der Region, ohne zu extendieren (Abb. 7). Die V-Gensegmente sind durch ausgefüllte Rechtecke dargestellt, deren genaue Lokalisierung durch die in 2.4. beschriebene Sequenzanalyse möglich war. Offene Balken symbolisieren pHc 79-Vektor-DNA. Im Fall von cos 121 wurde die Fremd-DNA in die Bam HI-Stelle des Vektors kloniert, in den übrigen Fällen in die Cla I-Stelle. Durch die gestrichelte Linie zwischen cos 121 und cos 650 wird der Anfang der überlappenden Bereiche markiert. Die durch "b" gekennzeichneten Spaltstellen können eine von beiden angegebenen Positionen einnehmen.



2.3. Die Region Chr. 22

Ursprünglich bestand die Region Chr. 22 aus vier überlappenden Cosmiden: cos 16, cos 51, cos 119 und cos 120 (Abb. 5.). Diese überdecken zusammen einen Bereich von 50 kb. Die Klone stammten aus verschiedenen Genbanken und wurden von Mitgliedern der Arbeitsgruppe kartiert und zur Verfügung gestellt (4.1.3.). Durch Hybridisierung mit Subgruppen-spezifischen Klonen konnten drei V_K -Gen-segmente verschiedener Subgruppen auf den Cosmiden der Region lokalisiert werden. Da das Ziel der Arbeitsgruppe die Kartierung des menschlichen V_K -Locus ist, wurde versucht, diese Region nach beiden Seiten zu verlängern und die Lage der Region im Genom festzustellen. Durch die Verlängerung in beide Richtungen sollte die Verbindung zwischen bereits charakterisierten Regionen hergestellt werden.

Abb. 5: Ausgangscosmide der Region Chr. 22.

Die Region Chr. 22 umfaßte vier überlappende Cosmide aus verschiedenen Genbanken (cos 16 - Genbank I, cos 51 - Genbank II, cos 119, 120 - Genbank III (4.3.1.)). Diese Cosmide wurden nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit kartiert, dies wird in den Dissertationen (38, 24) von H.R. Jaenichen (cos 51) und B. Straubinger (cos 119, cos 120), sowie der Diplomarbeit (39) von K. Mühlebach (cos 16) beschrieben. Sie werden hier gezeigt, da sie in dieser Arbeit weiter analysiert wurden.

Die pHc 79-Vektoren sind als offene Balken, die V-Gen-segmente sind als ausgefüllte Rechtecke dargestellt. Durch punktierte Linien sind mit Human-Placenta-DNA hybridisierende Bereiche gekennzeichnet. Durch Linien werden diejenigen Fragmente markiert, die als mögliche Extensions-Suchklone getestet wurden. Aus cos 119 waren dies ein 0,9 kb Bgl II-Bam HI-Fragment (m 119-1) und ein 1,3 kb Xho I-Bam HI-Fragment (m 119-2). Aus cos 16 ein 0,6 kb Hind III-Fragment (m 16-3) und ein 1,6 kb Hind III-Fragment (m 16-4).

Das 5,2 kb Sma I-Bam HI-Fragment aus cos 16 wurde genauer analysiert und ist vergrößert wiedergegeben. Durch ein "b" wird eine Pst I-Spaltstelle gekennzeichnet, die nur in einer der beiden Anordnungen vorkommen kann.

2.3.1. Konstruktion von Suchklonen zur Cosmid-Extension.

Als Extensions-Suchklone eignen sich DNA-Fragmente von Cosmiden bzw. von Regionen, die möglichst nahe an deren Enden liegen und nur in einer oder sehr wenigen Kopien im Genom vorkommen. Diese Klone wurden außerdem zur chromosomalen Lokalisierung der untersuchten Strukturen verwendet.

Zur Suche geeigneter DNA-Fragmente für die 5'-Extension der Region Chr. 22 wurden Kartierungsfilter von cos 119 mit radioaktiv-markierter Placenta-DNA hybridisiert (2.2.1.). Fragmente mit repetitiven Sequenzen ergaben ein Signal. Aus nicht-hybridisierenden Randfragmenten wurden zwei M13-Klone konstruiert (Abb. 5). Ein 0.9 kb Bgl II- Bam HI- Fragment (m 119-1) wurde isoliert und in die Bam HI-Stelle von M13 mp7-DNA kloniert (4.2.7.). Das Fragment konnte zur präparativen Isolierung mit der Nuklease Eco RI aus der Vektor-DNA gespalten, isoliert (4.2.6.) und in einem kleinen Volumen ligiert werden. Zur Konstruktion des zweiten Klons wurde ein 1,3 kb XhoI-Bam HI- Fragment isoliert (m 119-2). Zur Erzeugung gleicher Restriktionsenden wurden synthetische Eco RI-Linker an die glatten Enden des Fragments addiert (4.2.8.). Das Fragment konnte dann mit der Nuklease Eco RI gespalten und in die Eco RI-Stelle von M13 mp10-DNA kloniert werden. Zur präparativen Isolierung konnte wie oben beschrieben vorgegangen werden.

Das Auffinden eines 3'-Extensions-Suchklons war wegen der drei V_K -Gensegmente an diesem Ende der Region schwierig, da die V_K -Gensegmente von langen homologen Flanken umgeben sind (41). Zur Suche nach entsprechenden DNA-Fragmenten wurde ein 5,2 kb Sma I- Bam HI- Fragment aus cos 16 isoliert und mit Restriktionsnukleasen kartiert, die Fragment-Enden erzeugen, die zur Klonierung in M13-DNA geeignet sind (Abb. 5). Repetitive Sequenzen wurden durch Hybridisierung mit Placenta-DNA festgelegt. Zwei

Hind III-Fragmente von 0,6 kb (m 16-3) und 1,6 kb (m 16-4; Abb. 5), die kein Signal zeigten, wurden in M13 mp10-DNA kloniert, Fragment-DNA isoliert und ligiert.

Diese vier Klone wurden durch Hybridisierung von Filtern mit gespaltener, elektrophoretisch-aufgetrennter Human-Placenta-DNA auf Kopienzahl im Genom überprüft. Dies ist notwendig, da durch den Vorversuch nur repetitive Sequenzen bestimmt werden können, die in einigen 100 Kopien im Genom vorkommen (2.2.1.). Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß die isolierten Fragmente im Vorversuch kein Signal mit radioaktiv-markierter Placenta-DNA ergaben, aber niedrig-repetitive Sequenzen enthalten und somit als Extensions-Suchklone ungeeignet sind. Die beiden Klone zur 5'-Extension (m 119-1, m 119-2) zeigten wenige Banden (Abb. 6); zur Cosmid-Isolierung wurde m 119-2 eingesetzt. Die beiden 3'-Klone m 16-3 und m 16-4 waren aufgrund der vielen Banden (5-10) in Gesamt-DNA-Hybridisierungen zur Cosmidisolierung nicht geeignet. (

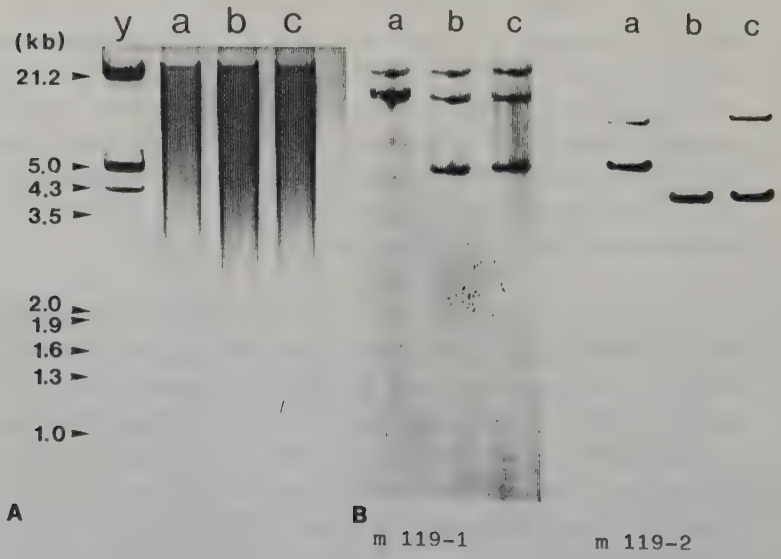


Abb. 6

Abb. 6: Gesamt-DNA-Hybridisierungen zur Überprüfung möglicher Extensions-Suchklone.

Bild A: Für Gesamt-DNA-Filter wurden 20 µg menschlicher Placenta-DNA mit den Nukleasen Eco RI (a); Xba I (b) und Bgl II (c) gespalten, auf 6 mm dicken, 1%igen Vertikal-Agarosegelen (Tris/EDTA/Borat-Puffer) aufgetrennt und auf Filter-Membranen (Gene Screen von New England Nuclear, Boston) transferiert. Als Marker wurde Eco RI- und Hind III-gespaltene λ -DNA (y) aufgetragen. Die Photographie eines mit Ethidiumbromid gefärbten Agarose-Gels ist abgebildet.

Bild B: Die Gesamt-DNA-Filter wurden mit den zu testenden Extensions-Suchklonen hybridisiert (4.2.2.), bis 0,5 x SSC nachgewaschen und mit Verstärkerschirmen (CaWo SE6) exponiert. Die Autoradiogramme zeigen Signale der 5'-Klone des Cosmides cos 119 (m 119-1, m 119-2). a, b, c entsprechen den oben genannten Spaltungen.

Als Alternative zu den 3'-Extensions-Suchklonen bot sich die Suche mit V_K -Gensegmenten selbst an. Durch die Sequenzanalyse der Gensegmente der Chr. 22-Region existierten geeignete Klone der Subgruppe III-Gensegments, das außerdem durch den Pseudogen-Charakter zur Extension dieser Region geeignet sein sollte (2.1.3.2.). Durch für dieses Gensegment spezifische 5'- und 3'-Flankenklone (m 120-12 bzw. m 120-11) konnten die isolierten Cosmide charakterisiert werden (Tabelle 2 und 3). Die gesamte, bisher charakterisierte Region Chr. 22 ist in Abb. 7 dargestellt.

Zusammenfassend sei gesagt, daß die Cosmide dieser Region durch Absuchen von Genbanken mit Suchklonen für die Subgruppe I (2.3.), II (Abb. 7) und III (2.1.3.2.) isoliert werden konnten. Außerdem gelang mit Hilfe des Suchklons m 119-2 (2.1.3.1.) die 5'-Extension dieser Region. Die ursprüngliche Situation (Abb. 5) von 50 kb konnte damit um 30 kb erweitert werden, so daß die Chr. 22-Region nun einen genomischen Bereich von 80 kb umfaßt.

Chr22

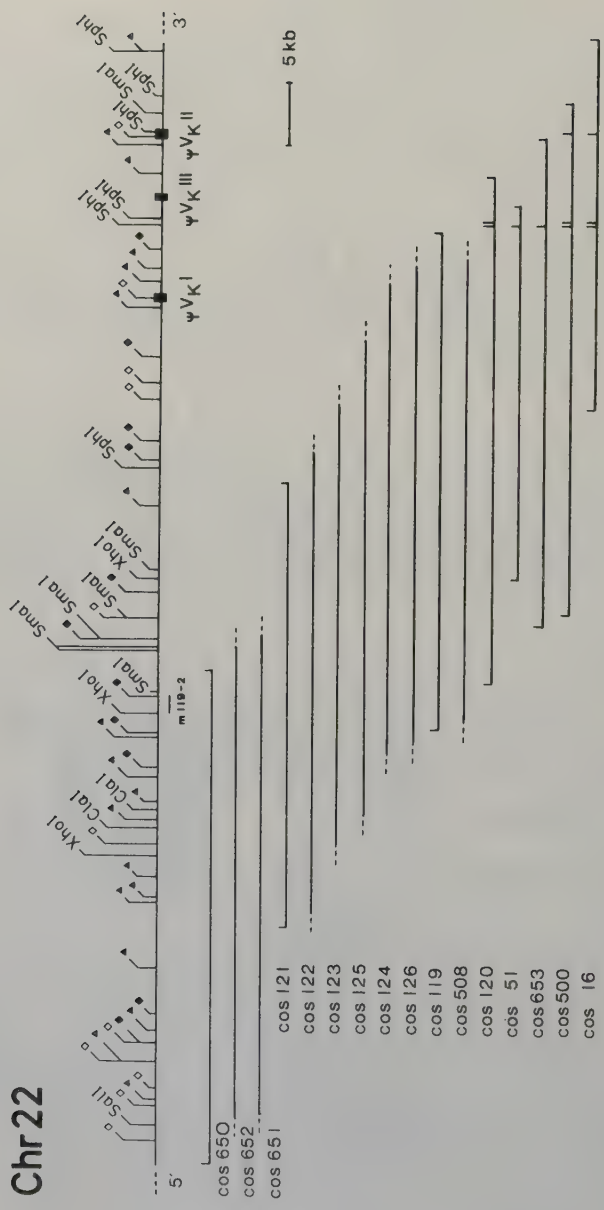


Abb. 7: Übersicht über die Region Chr. 22

Die gesamte, bisher analysierte Region Chr. 22 ist in dieser Abbildung dargestellt. Die charakterisierten Cosmide werden durch Klammern repräsentiert; durch Stricheln begrenzte Linien kennzeichnen Klone, die nur durch Restriktionsfragment-Vergleiche zugeordnet wurden. Drei von B. Straubinger (24) mit einem Subgruppe II-Klon isolierte, und von W. Pargent (42) kartierte Cosmid-Klone gehören ebenfalls der Region Chr. 22 an, sind jedoch nicht abgebildet. Zwei dieser Cosmide sind cos 653 sehr ähnlich, das dritte entspricht von der Lage cos 16. Auch diese Klone brachten keine 3'-Extension der Chr. 22-Region.

V-Gensegmente werden durch ausgefüllte Rechtecke dargestellt. Die am häufigsten spaltenden Restriktionsnukleasen sind durch Symbole gekennzeichnet: (◆) Bam HI, (◇) Kpn I, (▲) Bgl II. Das 1,3 kb Xho I-Bam HI-Fragment aus cos 119, das als Extensions-Suchklon (m 119-2) eingesetzt wurde, wird durch eine Linie markiert. Cosmide, die dem gleichen Allel angehören, sind an den unterschiedlichen Sph I-Spaltstellen zu erkennen, die auf den Cosmiden eingezeichnet sind.

2.3.2. Chromosomale Lokalisierung und allelische Situation der Region Chr. 22

Bei Kartierungen genomischer Regionen durch Erweiterung von Cosmiden und Verknüpfung charakterisierter Bereiche ("chromosomal walking") ist es notwendig, die Lokalisierung der untersuchten Cosmide bzw. Regionen auf bestimmten Chromosomen zu kennen. In der Arbeitsgruppe waren verschiedene Cosmide bzw. Regionen charakterisiert und spezifische Subklone daraus isoliert worden (Tabelle 1). Zur chromosomalen Lokalisierung wurden mit radioaktiv-markierter DNA dieser Klone Filter hybridisiert, die gespaltene DNA verschiedener Hybrid-Zelllinien enthielten. Diese Zelllinien wurden durch Fusion von Maus- oder Hamster-Zellen mit menschlichen Fibroblasten erzeugt und enthielten neben den kompletten Maus- bzw. Hamster-Chromosomen nur noch einen Teil der menschlichen Chromosomen (43). Durch biochemische und zytogenetische Analysen wurde bestimmt, welche menschlichen Chromosomen noch in den Hybriden enthalten waren.

Die Hybridisierungsversuche wurden von E. Lötscher durchgeführt (25, 32). Die Chr. 22-Region konnte mit Hilfe des Extensions-Suchklons m 119-2 (Abb. 7) auf Chromosom 22 lokalisiert werden. Da die Region durch mehrere überlappende Cosmide repräsentiert wird (Abb. 7), kann eine artifizielle Zusammensetzung durch Ligierung von DNA-Fragmenten während der Konstruktion einer Genbank ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurde der Klon m 120-12 (Abb. 9b), ein spezifisches 5'-Flankenfragment des V_{KIII} -Pseudogensegments aus cos 120, getestet. Mit diesem Klon ergaben sich Signale mit allen Chromosom 2 und 22 enthaltenden Hybriden. Für diesen Befund gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten, die Hybridisierung mit Chromosom 2 kann durch ein zur Region Chr. 22 homologes Gensegment oder durch unspezifische Hybridisierung des Klons mit Flanken anderer Gensegmente des V_K -Locus hervorgerufen werden. Die erste Möglichkeit ist zugleich ein Hinweis auf eine mögliche Duplikation. Außer dieser Region konnten zwei weitere V_K -Gensegmente auf anderen Chromosomen lokalisiert und dieses Ergebnis erstmals beschrieben werden (25). Durch in-situ-Hybridisierung von Metaphase-Chromosomen war der menschliche V_K -Locus bisher ausschließlich auf Chromosom 2 lokalisiert worden (28, 29).

Da durch die Ergebnisse der Untersuchung von M. Pech an den L-Regionen A und B Hinweise auf Duplikationen innerhalb des V_K -Locus existierten (22), war auch für die Chr. 22-Region der Frage nach einer möglichen Duplikation nachgegangen worden.

Bei der Kartierung einiger Cosmide aus dieser Region war ein Sph I-Spaltstellen-Unterschied im 5'-Flankenbereich des V_{KIII} -Pseudogensegments aufgefallen (Abb. 7). Dadurch entstehen zwei verschieden große Sph I-Fragmente (7,0 kb und 7,5 kb), die mit Hilfe des Subklons m 120-12 (Abb. 9b) identifiziert werden können und somit bot sich die Möglichkeit, damit Duplikationen nachzuweisen.

Durch die Untersuchung von Gesamt-DNA einer größeren Anzahl nicht-verwandter Individuen im Hinblick auf Spaltstellen-Unterschiede lassen sich Aussagen über Duplikationen und die allelische Situation von genomischen Regionen machen. Aus peripherem Blut von neun verschiedenen Individuen war von M. Pech DNA präpariert (22) und zur Verfügung gestellt worden. Die DNA's wurden mit der Nuklease Sph I gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt, auf Filter transferiert und mit dem Subklon m 120-12 hybridisiert. Abb. 8 zeigt das Ergebnis dieses Experiments.

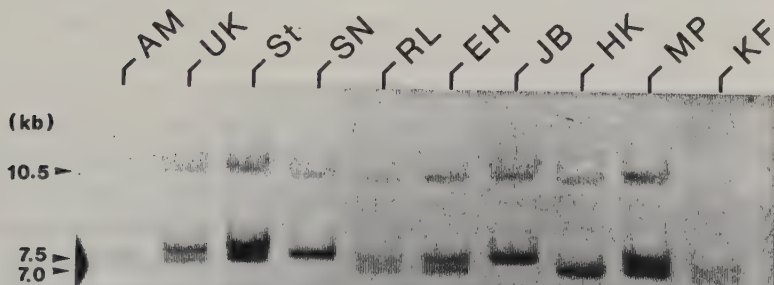


Abb. 8: Autoradiogramm einer Filter-Hybridisierung zur Untersuchung der allelischen Situation der Region Chr. 22

Gesamt-DNA von neun nicht-verwandten Individuen und Placenta-DNA (St) wurden mit der Nuklease Sph I gespalten, auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und auf einen Filter (Gene Screen Plus, New England Nuklear, Boston) transferiert. Dieser wurde mit radioaktiv-markierter DNA des Subklons m 120-12 hybridisiert, bis 0,5 x SSC nachgewaschen und mit Verstärkerschirm exponiert.

Bei den verschiedenen Individuen sind in Bezug auf die beiden zu untersuchenden Banden, unterschiedliche Situationen zu sehen. Es treten sowohl beide Sph I-Fragmente (heterozygote Situation), als auch nur eines der beiden Fragmente auf (Homozygote Situation für beide Fragmente). Dieser Befund spricht dafür, daß es sich bei den charakterisierten Cosmiden um allelische Varianten der Region Chr. 22 handelt. Im Fall einer Duplikation müßten alle Individuen die gleiche Situation zeigen. Die dritte Bande, die bei allen Individuen auftritt, könnte durch Hybridisierung eines zur Chr. 22-Region homologen Gensegments auf Chromosom 2 oder durch unspezifische Hybridisierung des Klons mit einer Flanke eines V_K -Gensegments hervorgerufen werden.

2.4 Sequenzanalyse der Gensegmente der Chr. 22-Region

Auf den Cosmiden der Region Chr. 22 konnten durch Hybridisierung mit Subgruppen-spezifischen Klonen drei V_K -Gensegmente gefunden werden (Abb. 4, 5, 7). Durch die Lokalisierung dieser Gensegmente außerhalb des V_K -Locus war es interessant, deren Nukleotid-Sequenz zu ermitteln und diese mit Sequenzen funktioneller Gensegmente zu vergleichen. Zur Sequenzierung wurden die V_K -Gensegment-enthaltenden Fragmente kartiert, der hybridisierende Bereich eingengt, subkloniert und schließlich sequenziert.

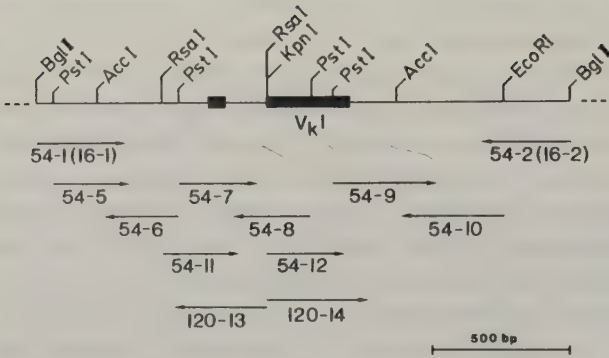
2.4.1. Kartierung und Subklonierung der mit V_K -Gensegmenten hybridisierenden Bereiche

Zur Sequenzierung der Gensegmente sollten die mit Subgruppen-spezifischen Klonen hybridisierenden Fragmente aus cos 54 (Abb. 12), cos 120 und cos 500 (Abb. 7) genauer untersucht werden. Die Cosmide wurden mit den entsprechenden Nukleasen in präparativem Maßstab gespalten, auf Agarosegelen aufgetrennt und die DNA der hybridisierenden Banden isoliert (4.2.6.). Die zu analysierenden Bereiche waren (a) ein 1,9 kb Bgl II-Fragment aus cos 54 und cos 120, (b) ein 3,6 kb Sph I-Fragment aus cos 120 und (c) ein 2,1 kb Bgl II-Sma I-Fragment aus cos 500 (siehe Abb. 9a-c). Cosmid cos 54 wird in Abschnitt 2.5. genauer beschrieben, es stimmt über 20 kb mit der Region Chr. 22 überein, enthält aber einen 5'-Bereich der keinerlei Homologie zeigt. Bei der Charakterisierung dieses Cosmids wurde das V_{KI} -Gensegment sequenziert.

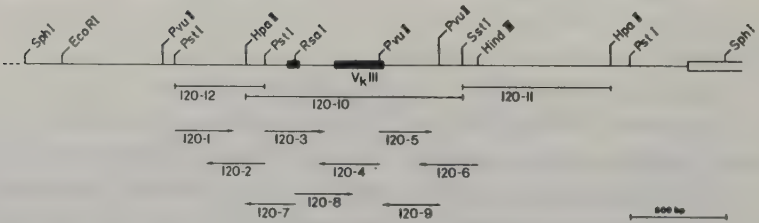
Wichtig bei der Kartierung dieser Fragmente sind interne Spaltstellen (z.B. Kpn I bei cos 54 und cos 500), die die relative Orientierung zum Cosmidklon angeben. Bei cos 120 wurde dies durch zusätzliche Kartierung des Cosmids mit Eco RI erreicht. Die zur Kartierung der Fragmente benutzten Nukleasen waren so ausgewählt worden, daß die bei der Spaltung entstehenden Enden zur Klonierung in M13-Vektoren geeignet waren (4.2.5.).

Zur Eingrenzung des Bereichs, der das V-Gensegment trägt, wurden die Kartierungsfilter mit den verschiedenen Subgruppen-spezifischen Klonen (Tabelle 1) hybridisiert. Zur Sequenzierung geeignete Fragmente wurden isoliert und in die entsprechenden M13-Vektoren, mp 8-11 und mp 18 und 19 ligiert (4.2.7.).

(a) cos I6, 54, I20



(b) cos I20



(c) cos 500

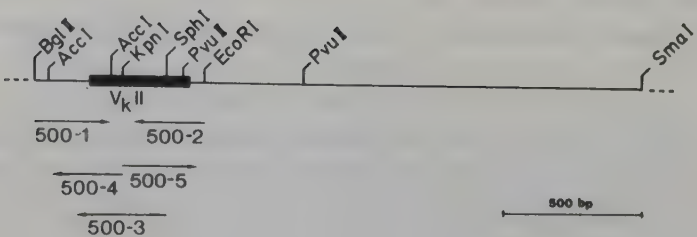


Abb. 9: Kartierung und Subklonierung von Fragmenten die V_K -Gensegmente enthalten.

Bereiche, die Gensegmente enthielten, wurden aus den Cosmiden cos 54, cos 120 und cos 500 isoliert und mit Nukleasen kartiert, die zur Klonierung in M13-Phagen-DNA geeignete Enden erzeugen (4.2.5.). Folgende Nukleasen wurden verwendet: Acc I, Eco RI, Hind III, Hpa II, Kpn I, Pvu II, Pst I, Rsa I, Sph I und Sst I. Zur Sequenzierung geeignete Fragmente wurden in M13-Vektoren kloniert. Die Signalsequenzen der Gensegmente und die codierenden Bereiche sind als ausgefüllte Rechtecke dargestellt. Die Sequenz-Strategie für die einzelnen Gensegmente ist durch Pfeile angedeutet, die die Sequenzier-Richtung angeben. Die Daten der Subklone sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. In (a) sind auch Klone aus cos 16 und cos 120 dargestellt, deren Sequenz zum Vergleich mit cos 16 bestimmt wurde. Subklone, die zur Isolierung bzw. Analyse von Cosmiden benutzt wurden (2.1.3.2.), sind in (b) durch Klammern gekennzeichnet. Durch offene Balken ist die Vektor-DNA dargestellt.

Die Sequenz-Strategie für die drei V_K -Gensegmente zeigt Abb. 9, die genauen Daten der einzelnen Subklone sind aus Tabelle 6 zu ersehen. Da das V_{KI} -Gensegment des Cosmids cos 54 sequenziert wurde, das nicht vollständig mit der Region Chr. 22 übereinstimmt, wurde zur Überprüfung auch das V_{KI} -Gensegment aus cos 120 subkloniert (Abb. 9a) und sequenziert (m 120-13, m 120-14).

Tabelle 6: Die Spalten der Tabelle zeigen die Cosmidklon-Nummern, die Bezeichnung der Subklone, die Restriktionsenden der Fragmente und der Vektoren, sowie die Größe der klonierten Fragmente. Die Nomenklatur ist bei den Abkürzungen erläutert.

Tabelle 6: Sequenzierungs- und Hybridisierungs-Subklone
aus der Region Chr. 22.

Cosmid	Subklon	Restriktionssenden des Fragments		Fragment- größe (bp)	M13-Vektor+ Spaltung
		5'	3'		

cos 16					
	m 16-1	Bgl II	Bgl II	1900	mp 8 (Bam HI)
	m 16-2	Bgl II	Bgl II	1900	mp 8 (Bam HI)
	m 16-3	Hind III	Hind III	600	mp10 (Hind III)
	m 16-4	Hind III	Hind III	1600	mp10 (Hind III)
cos 54					
	m 54-1	Bgl II	Bgl II	1900	mp 8 (Bam HI)
	m 54-2	Bgl II	Bgl II	1900	mp 8 (Bam HI)
	m 54-3	Bam HI	Bam HI	3700	mp 8 (Bam HI)
	m 54-4	Bam HI	Bam HI	2700	mp 8 (Bam HI)
	m 54-5	Pst I	Pst I	450	mp 8 (Pst I)
	m 54-6	Pst I	Pst I	450	mp 8 (Pst I)
	m 54-7	Pst I	Pst I	480	mp 8 (Pst I)
	m 54-8	Pst I	Pst I	480	mp 8 (Pst I)
	m 54-9	Pst I	Eco RI	620	mp8 (PstI/EcoRI)
	m 54-10	Pst I	Eco RI	620	mp9 (PstI/EcoRI)
	m 54-11	Rsa I	Rsa I	380	mp 8 (Sma I)
	m 54-12	Rsa I	Eco RI	860	mp8 (SmaI/EcoRI)
cos 120					
	m 120-1	Pst I	Pst I	480	mp 8 (Pst I)
	m 120-2	Pst I	Pst I	480	mp 8 (Pst I)
	m 120-3	Pst I	Pvu II	600	mp10 (PstI/SmaI)
	m 120-4	Pst I	Pvu II	600	mp11 (PstI/SmaI)
	m 120-5	Pvu II	Pvu II	320	mp10 (Sma I)
	m 120-6	Eco RI	Hind III	2200	mp8(HindIII/EcoRI)
	m 120-7	Eco RI	Rsa I	1240	mp11 (RsaI/EcoRI)
	m 120-8	Rsa I	Hind III	960	mp11(RsaI/HindIII)
	m 120-9	Pvu II	Pvu II	1480	mp 8 (Sma I)
	m 120-10	Hpa II	Sst I	1100	mp10 (AccI/SstI)
	m 120-11	Sst I	Hpa II	800	mp10 (AccI/SstI)
	m 120-12	Pst I	Pst I	500	mp 8 (Pst I)
	m 120-13	Kpn I	Bgl II	1100	mp19 (KpnI/BglII)
	m 120-14	Bgl II	Kpn I	800	mp19 (KpnI/BglII)
cos 500					
	m 500-1	Bgl II	Eco RI	610	mp10(BamHI/EcoRI)
	m 500-2	Bgl II	Eco RI	610	mp11(BamHI/EcoRI)
	m 500-3	Bgl II	Sph I	470	mp18 (SphI/BamHI)
	m 500-4	Bgl II	Kpn I	310	mp19 (KpnI/BamHI)
	m 500-5	Kpn I	Sma I	2200	mp19 (KpnI/SmaI)

2.4.2. Sequenzen der V_K -Gensegmente der Region Chr. 22

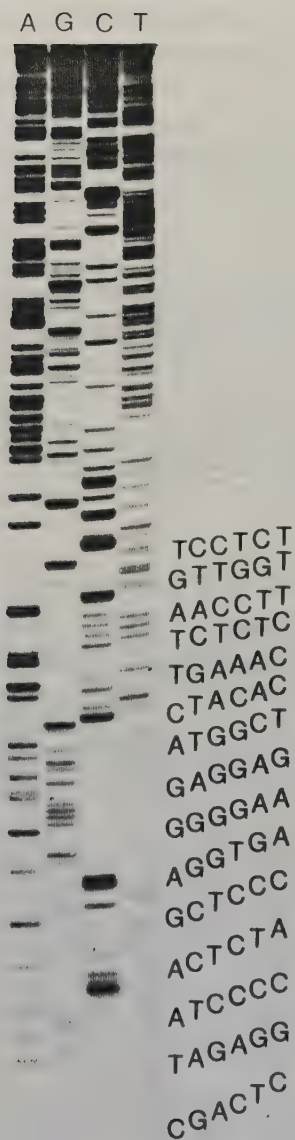
Die Sequenz-Strategie war so angelegt, daß die Genbereiche (Signalsequenz, Intron und codierender Bereich) jeweils mit Strang und Gegenstrang sequenziert wurden. Außerdem wurde über Spaltstellen sequenziert, die zur Fragment-Klonierung benutzt worden waren. Auf diese Weise sollte die Fehlerrate auf ein Minimum reduziert werden.

Die beschriebenen Klone wurden nach der "Dideoxykettenabbruch-Methode" sequenziert (44, Abb. 10). Mit 100 cm langen Gelen war es möglich Oligonukleotide bis zu einer Länge von 500 bp zu bestimmen (4.2.9.). Die durch die einzelnen Reaktionen erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe eines Computers ausgewertet (4.2.10.).

Abb. 10: Autoradiogramme von Sequenzgelen.

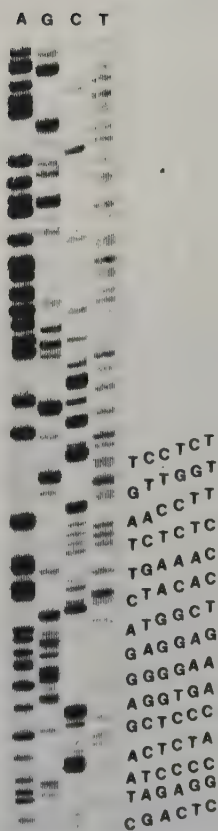
Bild A: Autoradiogramm eines Sequenzgels mit Sequenzreaktionen des Subklons m 120-8 (Abb. 9b). Die Reaktion wurde elektrophoretisch aufgetrennt, bis der Bromphenolblau-Marker am unteren Rand des Gels angelangt war. Die Nukleotid-spezifischen Reaktionen (A, G, C, T) sind über den entsprechenden Bahnen des Gels angegeben. Im vorliegenden Fall waren 107 Nukleotide zu bestimmen (vgl. Abb. 11(b), Position -217 bis Position -110 der dargestellten Sequenz).

Bild B: Autoradiogramm eines Sequenzgels des gleichen Subklons, wobei die "direct blotting" - Elektrophorese nach S. Beck und F.M. Pohl (45) getestet wurde. Die Reaktionen sind in derselben Reihenfolge wie oben aufgetragen und vier Stunden bei 600 V aufgetrennt worden.



A

Abb. 10



B

In Abb. 11 sind die Nukleotid-Sequenzen der V_K -Gensegmente dargestellt. Im Falle der Gensegmente der Subgruppe I und III wurden jeweils Teile der flankierenden Bereiche sequenziert, insgesamt 1.9 kb bzw. 1.5 kb. Bei der Sequenzanalyse von cos 500 wurde festgestellt, daß die Signalsequenz des V_{KII} -Gensegments nicht mehr auf dem isolierten Fragment lokalisiert war. Die Sequenz umfaßt 550 bp aus dem Intron und dem codierenden Bereich.

Die translatierten Sequenzen wurden anhand charakteristischer Aminosäuren (invariante Aminosäuren (12)), die mit einer Häufigkeit von 95% an der jeweiligen Position in einer Subgruppe erscheinen, den entsprechenden Subgruppen zugeordnet. Bei der Analyse der Sequenzen zeigten alle drei V_K -Gensegmente Mutationen, die bewirken, daß sie nicht mehr für funktionelle Polypeptide codieren können. Das bedeutet, daß alle hier analysierten V_K -Gensegmente Pseudogene sind.

Das V_{KI} -Gensegment (Abb. 11a) weist eine Mutation im Start-Codon auf und die für die Umlagerung essentielle Heptanukleotid-Sequenz entspricht nicht der Consensus-Sequenz. Außerdem mußte, um größtmögliche Übereinstimmung der invarianten Aminosäuren zu erzielen, in der Subregion FR3 eine Insertion von 7 bp eingeführt werden, die eine Rasterverschiebung bedingt. Die Nukleotid-Sequenzen der Subgruppe I-Gensegmente aus cos 54 und cos 120 waren identisch.

Das in Abb. 11b dargestellte V_{KIII} -Gensegment enthält in der Subregion FR2 ein Stop-Codon und ist am 3'-Ende unvollständig. In der FR3-Region bricht die Homologie zu anderen Gensegmenten dieser Subgruppe ab und die V-J-Umlagerungs-Sequenzen fehlen.

(c)

```

AGATCTTGAAATAGAGTTTCGTACTGGCTAGTAATTTGTCATTTCATTTTGAAGGCTACTTTTGATGATATAAATCTAACTTBAAAAATACGTAA -96
                                     L' FR1
CTGTAAATGAATATCATAGGGAAATCATGAAGTTGCTCATAGTGTGCTATATAACCTTACACTTCTTTTCATGTTATTTCAGGGTCCAGTGGGGATAT 2
                                     GlySerSerGlyAspI1
                                     CDR1 27 A B C D E
eMetMetThrGlnThrProLeuSerLeuLeuValThrProGly * LeuAlaSerIleSer CysArgSerSerHisSerLeuValThrArgGlyGlu 29
TATGATGACCCCAACTCCACTTCCTCTGCTCGTCCACCCCTGGATAGCTGECCTCCATCTCCTTCTGCAGGTCTAGTCACAGCCTTGATATACAGGGGGGAA 105
                                     FR2
* ThrTyrLeu - TrpTyrLeuGlnLysProGlyGlnSerLeuGlnLeuLeuIleTyrLeuValLeuAlaSerAlaValProAspArgLeuS 63
TAAACCTATTITGTT - TGGTACCTGCAGAGAGCCAGGCCAGTCTCTACAGCTCCCTGATCTATTIGGTTTGAACCGGGGCTCTGCAGTCCCGACAGACGGCTCA 204
                                     FR3
erGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuLysIleSerArgValGluAlaGluAspValGlyValThrHisCysMetGlnAlaLeuGlnThrPro 95
GTTGGCAGTGGGTCAAGACATGATTTACACACTGAATAATCAGCCGGGTGGAGGCTGAAGATGTTGGGGTTTATCACATGCATGCAAGCTCTACAAACTCTCTCC 304
                                     CDR3
CACAGTGGTACAGTCCCTCCCAAGAAACCTCCCTCTCTGTGGCATCCCAAGCTGCTCACAATGCACATGCACCTGCTTGTCTGGGGAGCAGCTCAGCAGGGTCTCTCTGGGTC 404
TGCAGAACACAGGAGGATILTTAAG 426

```

Abb. 11

Abb. 11: Sequenzen der V_K-Gensegmente der Region Chr. 22.

In (a) ist die Nukleotid-Sequenz des Subgruppe I-Pseudogen-Segments aus cos 54 bzw. cos 120 abgebildet; (b) zeigt die Subgruppe III-Pseudogen-Sequenz aus cos 120 und (c) die Sequenz des Subgruppe II-Pseudogens aus cos 500. Die vier Nukleotide werden durch A, G, C und T repräsentiert.

Die regulatorisch wichtigen pd-, dc-Sequenzen (46) und die TATA-Box (47), sowie die V-J-Umlagerungs-Signalsequenzen (48, 49) sind unterstrichen. Die Grenzen der codierenden Regionen wurden durch Vergleich mit veröffentlichten Aminosäure-Sequenzen (12) und mit Hilfe der Exon-Intron-Spleiß-Regeln (47) identifiziert. Die formalen Translationsprodukte sind über den Nukleotid-Sequenzen abgebildet. Invariante Aminosäuren nach Kabat (12) sind unterstrichen; eine Linie über einer Aminosäure bedeutet, daß eine invariante Aminosäure durch eine andere Aminosäure ersetzt wurde. In den translatierten Bereichen sind die folgenden Subregionen der V-Gensegmente gekennzeichnet: L, L'-Signalpeptid; FR1, 2, 3-"framework-regions" und CDR1, 2, 3-"complementarity determining regions". Die Subregionen wurden ebenfalls durch Vergleich mit veröffentlichten Aminosäure-Sequenzen (12) festgelegt. Mögliche Insertionen werden durch Klammern, Deletionen durch ▲ markiert. Insertionen und Deletionen wurden eingeführt, um größtmögliche Homologie in den invarianten Aminosäuren zu erreichen.

Das Gensegment der Subgruppe II (Abb. 9c) enthält zwei Stop-Codons in der FR1-Region und in der CDR1-Region, außerdem eine Insertion von 3 bp in FR1 und eine Deletion von 1 bp in CDR1, die eine Rasterverschiebung mit sich bringt.

Während der Sequenzanalysen wurde ein von S. Beck und F.M. Pohl (45) entwickeltes Sequenzierungs-System getestet, das zur Vereinfachung der Sequenzierung beitragen sollte (Abb. 10). Die Methode beruht darauf, die in einem kurzen Polyacrylamidgel (14cm) aufgetrennten DNA-Moleküle direkt während der Elektrophorese an eine Membran zu binden, die mit konstanter Geschwindigkeit am Gel Ende vorbeigeführt wird. Mit dieser Methode sollen pro Reaktion bis zu 500 Nukleotide zu bestimmen sein. Dies würde die Sequenzierung vereinfachen und durch die klei-

nen Gele wäre deren Handhabung einfacher. Mit den Reagentien und Puffern, die üblicherweise in der Arbeitsgruppe benutzt wurden, ließen sich relativ gute Ergebnisse erzielen; um jedoch 500 Nukleotide pro Lauf bestimmen zu können, sind noch Verbesserungen notwendig.

2.5. Analyse zur Region Chr. 22 teilweise homologer Cosmide

Nach Charakterisierung der von M. Pech aus den Genbanken I und II isolierten Cosmide, zeigte sich, daß ein großer Teil dieser Klone zwei Vektoren und zwei verschiedene, teilweise sehr kleine DNA-Fragmente enthielt oder, daß mehr als eine Vektor-Kopie auftrat (16). Für die Region Chr. 22 existieren zwei Cosmide (cos 17, cos 54), die teilweise mit der Region übereinstimmen, außerhalb des Homologiebereichs jedoch völlig verschieden sind (Abb. 12). Diese Cosmide waren von K. Mühlebach kartiert (39) und zur Verfügung gestellt worden. Es stellte sich die Frage, ob diese Cosmide Ligierungsartefakte oder von Region Chr. 22 verschiedene genomische Strukturen darstellen. Zur Klärung sollten verschiedene Experimente beitragen.

Aus den Klonen cos 54 und cos 16 war jeweils das 9,0 kb Bam HI-Fragment, das mit dem Subgruppe I-spezifischen Klon hybridisiert, isoliert und mit den Nukleasen: Acc I, Eco RI, Hpa II, Taq I und Hind III kartiert worden (Abb. 12). Die beiden Fragmente erwiesen sich als identisch.

Wie im vorigen Abschnitt erwähnt, waren die Sequenzen des 1,9 kb Bgl II-Fragments aus cos 54 und cos 120 identisch. Das gleiche Ergebnis brachten Sequenz-Analysen der Bgl II-Fragmente aus cos 54 und cos 16. Dabei wurden jeweils von jeder Seite von den Bgl II-Stellen der beiden Fragmente aus 250 bp der Flankenregionen der Gensegmente

sequenziert (siehe Abb. 9(a)). Diese Befunde deuten darauf hin, daß der homologe Bereich aus cos 54 identisch mit der Region Chr. 22 ist. Aus cos 54 wurden außerdem zwei Bam HI-Fragmente isoliert und in Bam HI-gespaltene M13-DNA kloniert (m 54-3 und m 54-4 (Abb. 12)). Der erste Klon (m 54-3) liegt im Homologie-Bereich zwischen diesen Cosmiden und der Chr. 22-Region, der letztere stammt aus dem nicht-homologen Bereich. Mit diesen Klonen wurden Filter hybridisiert, die gespaltene DNA der Cosmide cos 16 und cos 51 (Abb. 7/ Region Chr. 22) sowie cos 17 und cos 54 enthielten. Mit m 54-3 ergaben alle Cosmide ein Signal, mit m 54-4 nur der Ausgangsklon. Dies ist ein weiterer Hinweis, daß die nicht-homologe cos 54-Flanke ein Artefakt darstellt. Ein weiterer wesentlicher Punkt ist, daß in allen weiteren Cosmid-Isolierungen keine Cosmide gefunden wurden, die diese beiden Situationen bestätigt hätten.

Nach diesen Ergebnissen können die beiden Cosmidklone cos 17 und cos 54 als Ligierungsartefakte angesehen werden, wobei die inserierte DNA aus verschiedenen Fragmenten zusammenligiert wurde. Allerdings kann nicht zwingend ausgeschlossen werden, daß cos 17 und cos 54 genomische Situationen wiedergeben, zumal auch bei Cosmiden aus Genbank III und IV gelegentlich Homologie-Abbrüche beobachtet wurden (23).

Abb. 12: Restriktionskarten von Cosmiden, die zur Region Chr. 22 teilweise homolog sind.

Die Cosmide cos 17 und cos 54 sind teilweise homolog zur Region Chr. 22, teilweise enthalten sie Bereiche die unterschiedlich sind. Die Homologie-Abbrüche sind durch vertikale Linien gekennzeichnet; die nicht-homologen Bereiche erstrecken sich in Pfeil-Richtung. Die V-Gen-segmente sind durch ausgefüllte Rechtecke dargestellt. Die Hybridisierungsklone aus cos 54 sind unterstrichen. Durch punktierte Linien werden repetitive Sequenzen repräsentiert und offene Balken stellen die Vektor-DNA dar. Das 9,0 kb Bam HI-Fragment aus cos 54, das durch genaue Kartierung mit cos 16 verglichen wurde, ist vergrößert dargestellt.

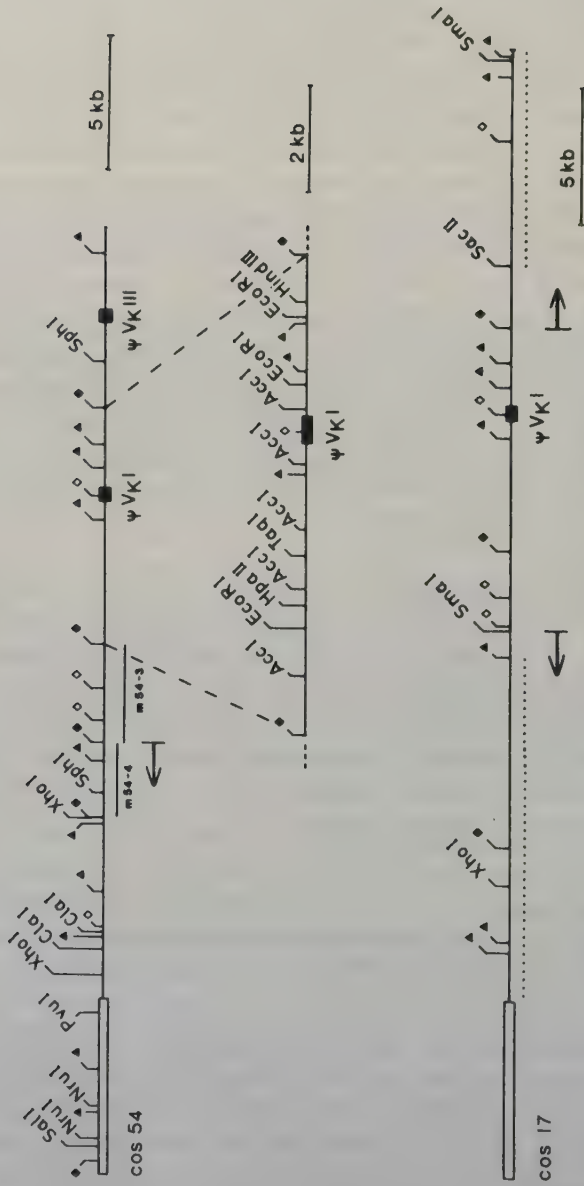


Abb. 12

3. DISKUSSION

3.1. Strategie zur Kartierung des menschlichen V_K -Locus

Das Ziel der Arbeitsgruppe ist die überlappende Kartierung des menschlichen V_K -Locus. Die Strategie, die angewandt wurde, um dieses Ziel zu erreichen, ist es, mit Subgruppen-spezifischen Klonen Cosmide aus Genbanken zu isolieren, die Cosmidklone zu charakterisieren und die analysierten Cosmide bzw. Regionen miteinander zu verbinden. Auf diese Weise wurden bisher mehrere Regionen mit einer unterschiedlichen Anzahl von V_K -Gensegmenten erhalten, die durch Extension verknüpft werden sollen.

Diese Methode setzt voraus, daß eine geeignete Probe zur Isolierung von Genen vorhanden ist. In diesem Fall wurde ein menschliches Subgruppe I-Gensegment über ein Maus V_K -Gensegment gefunden (16). Bei der Untersuchung von Multigenfamilien mit vielen homologen Genen ergibt sich der Vorteil, daß mit einem solchen Suchklon viele Genenthaltende Klone gefunden werden, so daß die Analyse eines Locus von mehreren Stellen aus erfolgen kann. Mit einem ähnlichen Ansatz wird versucht, die V_H -Genfamilie des Menschen zu analysieren, wobei bisher 60 Gensegmente in einer Region von 900 kb festgelegt werden konnten (5). Nach dieser Methode gelang es auch den größten Teil des MHC-Locus der Maus zu kartieren (50/51).

3.2. Cosmid-Isolierungen aus Genbanken

Die in der vorliegenden Arbeit genau untersuchte Region Chr. 22 bestand ursprünglich aus mehreren überlappenden Cosmiden. Diese Region sollte nach beiden Seiten verlän-

gert werden. Versuche zur Extension in die 5'-Richtung (2.1.3.1.) brachten das gewünschte Ergebnis nachdem zwei verschiedenen konstruierte Genbanken abgesucht worden waren. Eine Extension in die 3'-Richtung konnte nach mehreren Versuchen bisher nicht gefunden werden. Allerdings traten bei fast allen Cosmidisolierungs-Experimenten, die in der Arbeitsgruppe mit Subgruppen-spezifischen Klonen durchgeführt wurden, Cosmide auf, die stets einen ähnlichen Bereich der Region Chr. 22 repräsentierten. Die Ursache dafür könnten gehäuft in bestimmten Bereichen auftretende Spaltstellen für die Enzyme sein, die zur Konstruktion der Genbanken benutzt wurden, oder das Fehlen dieser Spaltstellen über einen weiten Bereich. Dies wäre eine Erklärung dafür, daß die Versuche zur Verlängerung in die 3'-Richtung bisher erfolglos waren.

Die Versuche zur 3'-Extension der Chr. 22-Region sollten außerdem der möglichst vollständigen Isolierung der Subgruppe III-Gensegmente dienen. Dabei ist die bereits beschriebene Heterogenität dieser Subgruppe zu beachten (2.1.4.). In welchem Umfang die Subgruppe III-Gensegmente mit den durchgeführten Versuchen erfaßt wurden, läßt sich deshalb schwer abschätzen. Eine Hilfe wäre, wenn die Anzahl der Gensegmente dieser Subgruppe festgelegt werden könnte, aber bisher war dies nicht möglich (18, 52). Auffällig ist jedoch, daß fast alle isolierten Cosmide bereits charakterisierten Regionen zuzuordnen waren (Tabelle 2 und 3). Daraus kann geschlossen werden, daß entweder alle existierenden V_K -Gensegmente gefunden wurden oder aber, daß mit den benutzten Suchklonen nur ein bestimmtes Spektrum erkannt wird. Für den zweiten Fall, müßten Isolierungs-Versuche mit Klonen durchgeführt werden, die stark divergente V_K -Gensegmente enthalten, um bisher nicht isolierte Gensegmente zu finden. Andererseits müßten noch nicht identifizierte Gensegmente über weitere Extensions-Schritte von den bereits charakterisierten Regionen aus gefunden werden.

3.3. Ligierungsartefakte bei der Konstruktion von Cosmid-Genbanken

Analysen an Cosmiden aus Genbank I und II zeigten, daß etwa die Hälfte der isolierten Klone mehr als eine Kopie des Vektors und ein oder zwei Placenta-DNA-Fragmente enthielten (16). Dieser Mangel ist auf ungenügende Größenfraktionierung der Placenta-DNA und unvollständige Phosphatase-Behandlung des Vektors bei der Konstruktion dieser Genbanken zurückzuführen. Zwei Cosmide, die in ihren Restriktionskarten nur teilweise mit der Region Chr. 22 übereinstimmen (Abb. 12), wurden genauer analysiert, um festzustellen, ob sie durch Ligierung verschiedener Fragmente bei der Genbank-Konstruktion entstanden waren oder, ob sie duplizierte Bereiche darstellen. Genaue Kartierung des Homologie-Bereichs und die Sequenzanalyse der Flankenregionen von Subgruppe I-Gensegmenten ergab völlige Übereinstimmung zwischen dem Cosmid cos 54 und der Chr. 22-Region. Durch Hybridisierungs-Experimente konnte der Homologieabbruch zwischen den Cosmiden cos 17, cos 54 (Abb. 12) und der Region Chr. 22 eingegrenzt werden (2.5.). Bei fast allen weiteren Cosmid-Isolierungen im Arbeitskreis (23, 24) konnten nur Klone gefunden werden, die mit dem bis jetzt charakterisierten Bereich der Region Chr. 22 übereinstimmen (Abb. 7). Wichtig ist, daß diese Region durch eine große Zahl überlappender Cosmide repräsentiert wird und somit als zusammenhängender, genomischer Bereich angesehen werden muß. Aus diesen Daten wurde geschlossen, daß die beiden Cosmide Ligierungsartefakte darstellen.

Vergleichbare Schwierigkeiten bei Cosmid-Isolierungen wurden von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben (51). Auch dort konnte bei einigen Cosmiden nicht zwischen Artefakt oder Duplikation unterschieden werden.

3.4. Verstreut im Genom auftretende V_K -Gensegmente

Der menschliche V_K -Locus war durch in-situ-Hybridisierung von Metaphase-Chromosomen mit Klonen von V_K -Gensegmenten und durch Hybridisierung von Zellhybrid-DNA mit C_K -Klonen auf Chromosom 2 lokalisiert worden (28, 29).

Die chromosomale Lokalisierung der in dieser Arbeitsgruppe charakterisierten Cosmide bzw. Regionen sollte zur Sicherheit nochmals überprüft werden, da bei Cosmidisierungs-Versuchen mit einigen Extensions-Suchklonen nur Klone gefunden wurden, die keine weiteren Gensegmente enthielten. Dazu wurden die zu jeder Region isolierten Suchklone verwendet. Zur Lokalisierung wurden Filter mit DNA einer größeren Zahl von Mensch-Maus- bzw. Mensch-Hamster-Hybriden (43) mit den Suchklonen getestet. Es konnte gezeigt werden, daß zwei einzelne V_{KI} -Gensegmente sowie die Gensegmente der hier analysierten Region Chr. 22 auf anderen Chromosomen lokalisiert sind (25).

Bei Untersuchungen an den λ - und k-leichten Ketten-Genen und an der V_H -Genfamilie der Maus konnten bisher keine Hinweise auf verstreut im Genom vorliegende Gensegmente gefunden werden (43, 53). Bei Analysen an einigen anderen Genfamilien wurden Pseudogene gefunden, die nicht auf demselben Chromosom lagen wie die untersuchte Genfamilie, z.B. bei den Globin-Genen der Maus (43, 54). Bei diesen Pseudogenen handelt es sich um Gene, die Intron-Sequenzen enthalten. Besonders auffällige Pseudogene, die ohne Intron-Sequenzen vorliegen ("prozessierte Pseudogene"), existieren in vielen Genfamilien und treten häufig verstreut im Genom auf (55). Auch bei menschlichen Immunglobulin-Genfamilien konnten solche Pseudogene gefunden werden, z.B. bei $J_\lambda C_\lambda$ (56) und C_ϵ (57); jedoch nicht für die Genfamilien der V-Gensegmente.

Für die Translokation von Genen auf andere Chromosomen gibt es mehrere Erklärungs-Möglichkeiten (43). Die Mobilisierung von Genen könnte durch transposable Elemente bewirkt werden, dann müßten kurze, für diese Elemente charakteristische repetitive Sequenzen in den Flanken translozierter Gene zu finden sein (58). Eine weitere Möglichkeit wäre durch Genkonversion-ähnliche Prozesse gegeben. Durch diese Vorgänge werden Gene in unveränderter Form transloziert, d.h. sie enthalten immer noch die Intron-Sequenzen.

Die folgenden Mechanismen setzen Transkription und Retro-Transkription der translozierten Sequenzen voraus. Intron-Sequenzen dieser Gene müssen danach genau an den Spleißstellen deletiert sein ("prozessierte Pseudogene"). Zum einen könnte dies nach Rekombination von Wirts-Sequenzen mit Retroviren der Fall sein (59). Die Integration des rekombinanten Retrovirus erfolgt über charakteristische repetitive Sequenzen ("long terminal repeats", LTR), die in den Flankenregionen translozierter Gene auftreten müßten. Die andere Möglichkeit wäre, daß aus zellulärer RNA cDNA-Moleküle synthetisiert werden, die wieder ins Genom integriert werden.

Da die in dieser Arbeit analysierten Gensegmente Intron-Sequenzen enthalten (Abb. 9), müßte ihre Translokation durch Transposition oder Genkonversion-ähnliche Prozesse erklärt werden. Unter der Annahme, daß diese Gensegmente zusammen transloziert wurden, wird es schwierig, dies mit Transposition oder Genkonversion zu erklären. Transposable Elemente wie auch Genkonversion in diesem Umfang sind bisher nicht bekannt. Möglicherweise muß für diese Gruppe ein neuer Rekombinations-Mechanismus angenommen werden. Um genaue Aussagen machen zu können, sind weitere Analysen an dieser Region notwendig. Es müßte die 3'-Extension dieser Region gefunden und nach weiteren

Gensegmenten in diesem Bereich gesucht werden; außerdem wäre es wichtig zu wissen, ob homologe Strukturen auf Chromosom 2 existieren.

3.5. Sequenz-Vergleiche zwischen Gensegmenten der Region Chr. 22 und funktionellen V_K -Gensegmenten

Da die drei Gensegmente der Region Chr. 22 auf ein anderes Chromosom transloziert worden waren, war es interessant deren Nukleotid-Sequenzen mit Sequenzen funktioneller Gensegmente des V_K -Locus zu vergleichen.

Aus den Analysen der Nukleotid-Sequenzen ergab sich für alle drei Gensegmente, daß es sich um Pseudogene handelt (2.4.2.). Die zu vergleichenden Nukleotid-Sequenzen wurden mit Hilfe der in Abschnitt 4.2.10. beschriebenen Computerprogramme zunächst mit der größtmöglichen Homologie untereinander geschrieben und dann die Divergenz der gesamten codierenden Region und der einzelnen Subregionen bestimmt. In Tabelle 7 sind die Werte aus den Vergleichen zusammengefaßt.

In früheren Arbeiten aus dieser Arbeitsgruppe waren Sequenz-Vergleiche zwischen Mitgliedern der Subgruppe I angestellt worden. Dabei zeigte sich, daß sich diese Subgruppe aus mehreren Untergruppen stark homologer Gensegmente zusammensetzt. Die Homologie zwischen den Mitgliedern dieser Untergruppen reichte von 77% bis 85% (16, 20).

Die Werte des Sequenzvergleichs zeigen, daß die translozierten Gensegmente im Verhältnis zu den ausgewählten funktionellen Gensegmenten stark divergent sind. Das Subgruppe I-Gensegment ist mit einer Gesamt-Homologie im

Tabelle 7: Sequenzvergleich zwischen V_K -Pseudogen-segmenten der Region Chr. 22 und funktionellen V_K -Gen-segmenten der entsprechenden Subgruppen.

verglichene

Gensegmente:	Chr.22/ V_K I mit Vb (20)	Chr.22/ V_K II mit V 6410 (18)	Chr.22/ V_K III mit Vg (21)
--------------	-----------------------------------	--	-------------------------------------

Gesamt-Homologie:	79,9%	69,9%	62,2%
-------------------	-------	-------	-------

Homologie zwischen den Subregionen:

Signalsequenz (L)	83,4%	-	91,7%
Intron	79,8%	-	47,9%
Signalsequenz (L')	72,7%	91,7%	75,0%
FR 1-Region	92,7%	85,7%	69,6%
CDR 1-Region	63,6%	75,0%	70,6%
FR 2-Region	88,9%	75,6%	84,4%
CDR 2-Region	61,9%	76,2%	85,7%
FR 3-Region	86,6%	91,7%	54,0%
CDR 3-Region	80,9%	57,1%	-

Die Nukleotidsequenzen wurden mit Hilfe von Computerprogrammen (4.2.10.) in größtmöglicher Homologie angeordnet. Anschließend wurden die kompletten Sequenzen und die einzelnen Subregionen der Gensegmente miteinander verglichen. Die Homologie zwischen den verglichenen Sequenzen ist in %-Werten angegeben.

codierenden Bereich von 80% noch am ähnlichsten zum Vergleichs-Segment. Die Homologie-Werte der beiden anderen Gensegmente von 70% bzw. 63% Gesamt-Homologie sind schon weit unter denen, die für divergente Mitglieder der Subgruppe I ermittelt wurden. Besonders auffällig ist das Gensegment der Subgruppe III dessen 3'-Ende und Umlagerungs-Signalsequenzen fehlen; auch ist die Homologie in der FR3-Subregion sehr gering. Solche Veränderungen wurden bisher bei keinem V_K -Gensegment gefunden. Daß Pseudogensegmente des V_K -Locus nicht in diesem Maß divergent zu funktionellen Gensegmenten sind, wurde darauf zurückgeführt, daß die Gensegmente des V_K -Locus Genkonversion-

ähnlichen Prozeßen unterworfen sind, die sowohl zur Diversifizierung als auch zur Konservierung der Mitglieder dieser Genfamilie dienen (20). Dies scheint bei den translozierten Gensegmenten nicht mehr oder nur in geringem Maß der Fall zu sein.

Ein weiterer Anlaß zur genaueren Analyse der V_K -Gensegmente der Region Chr. 22 war, daß der menschliche V_λ -Locus auf dem Chromosom 22 lokalisiert ist (60). Da es sich um stark divergente V_K -Gensegmente handelt, wurden die formal translatierten Aminosäure-Sequenzen dieser Gensegmente mit denen der bisher bekannten V_λ -Gensegmente (12) verglichen. Die gefundenen Homologien waren jedoch durchweg geringer, als die mit den V_K -Gensegmenten gefundenen.

3.6. Pseudogene in Multigenfamilien

Sequenzanalysen dieser und anderer Arbeitsgruppen ergaben, daß Pseudogene einen großen Teil des V_K -Repertoires bilden (16, 20, 61). Auch bei anderen Multigenfamilien scheint dies der Fall zu sein (43, 58, 62). Nach den Ergebnissen zur Lokalisierung von V_K -Gensegmenten kann man annehmen, daß von den Pseudogen-Segmenten dieser Genfamilie nur ein geringer Teil auf andere Chromosomen transloziert wurde (25).

Die Entstehung von Pseudogenen ist wahrscheinlich eng verbunden mit der Evolution von Multigenfamilien, vor allem bei den V-Gensegmenten der Immunglobuline, deren Funktion eine hohe Diversifizierung erfordert. Multigenfamilien scheinen durch Amplifizierung von Vorläufergenen entstanden zu sein. Als Mechanismus für die Ausweitung und die Verkleinerung der Multigenfamilien wird ungleiches Cross-over angesehen, während die Divergenz zwischen den einzelnen Mitgliedern durch Punktmutation, Deletion,

Insertion oder Genkonversion erfolgt (41, 63). Daß durch die ständigen Veränderungen auch Mutationen erzeugt werden, die zur Inaktivierung der betroffenen Gene führen, scheint unvermeidbar.

Es ist ungeklärt, ob Pseudogene innerhalb der Genfamilien noch eine Funktion erfüllen, z.B. als Donor- oder Akzeptorsequenzen in Genkonversion-ähnlichen Prozessen. Auf diese Weise könnten sie zur Diversifizierung der Immunglobuline beitragen. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß diese nicht-funktionellen Gensegmente ohne Selektionsdruck im Laufe der Zeit Mutationen akkumulieren und völlig verloren gehen (54). Dies gilt vor allem für translozierte Gensegmente.

3.7. Anzahl und Orientierung von V_K -Gensegmenten

Die V_K -Genfamilie war unter anderem deswegen als Untersuchungsobjekt gewählt worden, weil aufgrund früherer Untersuchungen die Zahl der Gensegmente auf nur 15 - 20 geschätzt worden war (14). Durch Gesamt-DNA-Hybridisierungen mit Subgruppen-spezifischen Klonen konnte gezeigt werden, daß die Anzahl der V_K -Gensegmente erheblich größer ist. Jedoch läßt sich auch durch diese Versuche die Gensegment-Zahl noch nicht genau bestimmen (18).

Untersuchungen von M. Pech an den L-Regionen A und B ergaben, daß die Gensegmente der verschiedenen Subgruppen der V_K -Genfamilie untereinander vermischt vorliegen (20, 22). Die Verteilung der Gensegmente der unterschiedlichen Subgruppen innerhalb der Region Chr. 22 ist ein weiteres Indiz dafür, daß dies in der V_K -Genfamilie generell der Fall ist. Nach den bisher bekannten Daten scheinen im Gegensatz dazu die Gensegmente der einzelnen Subgruppen der V_H -Genfamilien der Maus und des Menschen in getrennten Gruppen zusammengelagert zu sein (64, 65).

Durch die Sequenz-Analysen konnte die Orientierung der Gensegmente innerhalb der Region Chr. 22 festgelegt werden. Alle Gensegmente der Region sind gleichsinnig angeordnet (Abb. 7), dies ist ebenfalls für die Gensegmente der L-Regionen A und B beschrieben worden (22). Es ist wichtig, die Anordnung der Gensegmente zu kennen, um Aussagen über den Umlagerungs-Mechanismus, der V- und J-Gensegmente zusammenbringt, machen zu können (22, 66, 67). Eine endgültige Klärung des Umlagerungs-Mechanismus ist erst dann möglich, wenn durch die Kartierung des gesamten V_K -Locus die Orientierung der V-Gensegmente untereinander und zu den J-Segmenten bekannt ist.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. MATERIALIEN

4.1.1 Chemikalien und Enzyme

Bactoagar und Bactotrypton wurden von Difco, Michigan, U.S.A. bezogen. Hefe-Extrakt lieferte die Firma Merck, Darmstadt. Alle anorganischen Reagenzien sowie Ethidiumbromid, SDS, Polyethylenglykol 6000 und Tris stammten ebenfalls von Merck, Darmstadt. Ampicillin ("Amblosin") wurde von der Bayer AG, Leverkusen, bezogen. Ficoll 400 stammte von Pharmacia, Schweden; Polyvinylpyrrolidon, Rinderserumalbumin (BSA) und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid (X-gal) lieferte die Sigma GmbH, München. Von Serva Feinbiochemika, Heidelberg, stammte Acrylamid und N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED); Bisacrylamid war ein Produkt der Firma Biomol, Ilversheim. Der Mischbettionenaustauscher AG 501-X8 wurde von Bio Rad Laboratories, Richmond, California, bezogen. Von Wacker-Chemie, München stammte γ -Methacryloxypropyltrimethyloxysilan, von BDH Chemicals Ltd., Poole, England das Dimethyldichlorsilan. Die radioaktiven Nukleotide (α - 32 P)dATP und (α - 32 P)dCTP wurden von New England Nuclear (NEN) verwendet. Desoxy- und Didesoxyribonukleotide, sowie Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) und Eco RI-Linker lieferte die Firma Boehringer, Mannheim. Der M13-Einzelstrangprimer (17bp) wurde von P.L. Biochemicals hergestellt.

Alle in der Arbeit verwendeten Restriktionsnukleasen stammten von Boehringer, Mannheim, mit Ausnahme von: Acc I und Sac II, die von New England Biolabs, Beverly geliefert wurden.

Folgende Enzyme wurden ebenfalls von Boehringer, Mannheim bezogen: T4-Ligase, alkalische Phosphatase (Kälberdarm), DNA-Polymerase I (Kornberg), DNA-Polymerase I (Klenow-Enzym), DNase I, RNase A und Polynukleotid-Kinase (E. coli).

4.1.2. Bakterienstämme, Phagen und DNA's

Der Bakterienstamm E. coli JM 103 (Δ lac pro, thi, str A, sup E, end A, sbc B15, hsd R4, F⁺ tra D 36, pro AB, lac I^q, Z Δ M15) wurde ebenso wie die von J. Messing (68) konstruierten M13-Phagen mp8-11 sowie mp 18, 19 von P.L. Biochemicals, Milwaukee, U.S.A. bezogen.

Lachsspermien- und E. coli-DNA lieferte die Firma Sigma GmbH, München; λ -Phagen-DNA (c1857 Sam 7) und pHc 79-DNA stammten von Boehringer, Mannheim.

4.1.3. Cosmidgenbanken, Cosmide und Hybridisierungs-klone

Die Genbanken I und II wurden von W. Lindenmaier, Stöckheim, konstruiert. Für beide Genbanken wurde Human-Placenta-DNA (St) mit Msp I partial gespalten und in die Cla I-Spaltstelle von pHc 79-Vektor-DNA ligiert (26). Die Genbanken wurden von M. Pech mit einem V_KI-Subklon (m 1-1) abgesucht (16).

Die Genbanken III und IV wurden von H.D. Pohlenz (23) bzw. B. Straubinger (24) aus derselben Placenta-DNA, die oben erwähnt wurde, konstruiert und zur Verfügung gestellt. Für Genbank III wurde Placenta-DNA mit Sau 3A partial gespalten und in die Bam HI-Stelle von pHc 79-

bzw. pJB 8-Vektor-DNA ligiert (20). Genbank IV bestand aus MspI- bzw. Taq I-gespaltener Placenta-DNA, die in die Cla I-Stelle des pHG 79-Vektors kloniert wurde.

Die bereits kartierten Cosmidklone cos 16, cos 17 und cos 54 wurden von K. Mühlebach (39), cos 51 von H.R.Jaenichen (38) und cos 119, cos 120 von B. Straubinger (24) zur Verfügung gestellt.

Die in Tabelle 1 erwähnten Suchklone stammten von H.R. Jaenichen (m 1-3), H.G. Klobeck (m 607V-3, m 41V-7, m 41UL-3), M. Pech (m 21-4, m 21-1), H. Smola (m 105-1), B. Straubinger (m 142-1), E. Lötscher (m 108-1, m 109-1) und H.D. Pohlenz (m 143-1).

4.2. METHODEN

4.2.1. Radioaktive Markierung von DNA

Um DNA für Hybridisierungs-Experimente benutzen zu können, wurde sie durch "Nicktranslation", wie in Ref. 69 beschrieben, mit(α - 32 P)dATP und(α - 32 P)dCTP mit Hilfe der DNase I und der DNA-Polymerase I aus E. coli radioaktiv markiert.

4.2.2. DNA-Transfer und Hybridisierung

DNA-Fragmente, die in Agarosegelen aufgetrennt worden waren, wurden kurz mit UV-Licht bestrahlt, um für große Fragmente effizienten Transfer zu gewährleisten. Anschließend wurde die DNA nach der Methode von Southern (70) auf Filter-Membranen (Gene Screen und Gene Screen

Plus von New England Nuklear, Boston) transferiert und durch backen bei 80°C im Vakuumofen bzw. durch Trocknen, für Gene Screen Plus, auf den Membranen fixiert.

Filter-Hybridisierungen mit radioaktiv-markierter DNA wurden wie in Ref. 71 beschrieben durchgeführt. Die Filter wurden in Hybridisierungslösung (4x SSC, 1x Denhardt-Lösung (72), 1% SDS, 0,1% Pyrophosphat) zwei Stunden bei 68°C vorgewaschen, anschließend zwei bis vier Stunden bei 68°C in Hybridisierungs-Lösung mit 100 µg/ml denaturierter Lachs-Sperm-DNA praehybridisiert und über Nacht in der gleichen Lösung mit 50 ng/ml denaturierter, radioaktiver DNA hybridisiert.

Für Genbank- und Anreicherungs-Experimente wurden der Hybridisierungs-Lösung E. coli-DNA (50 µg/ml) und pHG 79 DNA (50 µg/ml) zugesetzt, um unspezifische Hybridisierung zu vermeiden. Als Proben für diese Versuche dienten ligierte, 0.5- 1.5 kb große DNA-Fragmente, deren Spaltprodukte aus der Nicktranslation sich aufgrund der Fragmentgröße besser zu Netzwerken zusammenlagern können, als DNA von M13-Klonen, und die somit stärkere Signale ergeben (73).

Das Nachwaschen der hybridisierten Filter unter nicht-stringenten Bedingungen erfolgte bis 2 x SSC, unter stringenten Bedingungen bis 0,1 x SSC. Die Filter wurden mit Röntgenfilmen (Fuji RX) und Verstärkerschirmen (Cawo SE6) bei -70°C exponiert.

4.2.3. In-situ-Hybridisierung von Bakterienkolonien

Zur Anreicherung hybridisierender Klone wurden Bakterienkolonien verdünnt und zwei Verdünnungsstufen ausplattiert, um sicher Einzelkolonien zu erhalten. Durch vorsichtiges Auflegen von Rund-Filtern (Colony/Plaque-

Screen von New England Nuclear, Boston) wurden die Kolonien größtenteils auf diese Filter transferiert.

Anschließend wurde durch NaOH-Behandlung Zell-Lyse und DNA-Denaturierung durchgeführt und die freie DNA an die Filter gebunden, wie in Ref. 74 beschrieben. Die Filter wurden bei 80°C im Vakuumofen getrocknet und dann hybridisiert, wie unter 4.2.2. beschrieben. Die Agar-Platten wurden bei 37°C inkubiert, bis die Bakterienkolonien nachgewachsen waren.

4.2.4. Präparation von DNA

Die Cosmidklone wurden in LB-Medium (10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt (75)) mit 75 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C angezogen. M13-Klone wurden vermehrt, indem zu 400 ml einer logarithmisch wachsenden JM 103-Bakterienkultur ($OD_{560} = 0,5$) 1 ml des entsprechenden Phagenüberstands zupipettiert und über Nacht inkubiert wurde.

Die DNA wurde anschließend nach der alkalischen Lyse-Methode (76) isoliert, wobei meist ein Reinigungsschritt durch CsCl-Gradientenzentrifugation ($n = 1,389$) im Vertikalrotor (15 h/ 45000 rpm) angeschlossen wurde (77). Die DNA wurde durch Ausschütteln mit einem CsCl-gesättigten n-Butanol/Isopropanol (1:1) - Gemisch von Ethidiumbromid befreit und 24 Stunden gegen Tris-EDTA-Puffer (ph 8.0) dialysiert.

Die Mengenbestimmung der DNA erfolgte nach zwei Methoden: die photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung bei einer Wellenlänge von 260 nm (1 OD entspricht 50 µg DNA/ml) oder mit Hilfe eines Vergleichs zu einer Verdünnungsreihe von DNA bekannter Konzentration auf Agarosegelen.

4.2.5. Restriktionskartierung

Zu analytischen Spaltungen von DNA wurde eine Menge von 1 µg mit einem bezüglich der Enzymaktivität leichten Überschuß an Restriktionsnuklease 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Nukleasen Taq I und Sma I wurden bei 65°C bzw. 25°C inkubiert. Für Doppelspaltungen wurden mit Ausnahme von Taq I, Sma I und Kpn I beide Enzyme gleichzeitig zugegeben, in den Ausnahmefällen wurde das erste Enzym nach der Inkubation durch Erhitzen inaktiviert, dann die DNA mit dem zweiten Enzym nachgespalten.

Als Spaltpuffer wurde ein Universalpuffer (T.Igo-Kemenes, persönliche Mitteilung) mit folgender Zusammensetzung benutzt: 1.5mM Spermin, 150mM Spermidin, 150mM Tris, 600mM KCl, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 2mM EGTA (Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N'-tetra-acetat) 70mM MgCl₂, 5mM Mercaptoethanol. Für Spaltungen mit Kpn I wurde der vom Hersteller (Boehringer) empfohlene Puffer verwendet (60mM Tris, 60mM NaCl, 60mM MgCl₂, 70mM Mercaptoethanol, pH 7.6). Nach der Spaltung wurden die Reaktionsgemische mit einem Viertel des Volumens an 50% iger Saccharose-Lösung mit Bromphenolblau versetzt und auf Agarosegelen aufgetrennt.

4.2.6. Gelelektrophoresen und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen

Agarose-Gelelektrophoresen wurden nach Ref. 78 in Horizontal-Elektrophoreseapparaturen durchgeführt. Die Agarose-Konzentration (SeaKem Agarose, Marine Colloids Inc., Rockland, Maine USA) variierten zwischen 0.7% und 1.5%, je nach Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente. Als Elektrophoresepuffer dienten entweder ein

Tris/EDTA/Borat-Puffer (90mM Tris, 2,5mM EDTA, 90mM Bor-säure; Ref. 79) oder ein Tris/Acetat-Puffer (40mM Tris, 20mM Acetat, 20mM NaCl, 2mM EDTA, pH 8,2; Ref. 80).

Für präparative Agarosegele zur Isolierung von DNA-Fragmenten, die größer als 0.5 kb waren, wurde SeaPlaque-Agarose (Marine Colloids Inc., Rockland, Maine USA) verwendet, die bei niedrigen Temperaturen schmilzt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten, bei 65°C geschmolzen, mit Phenol extrahiert und die DNA mit Ethanol gefällt (81). Fragmente, die kleiner als 0.5 kb waren, wurden über 4%ige Polyacrylamidgele (1/20 Bis-acrylamid, Tris/Borat-Puffer) isoliert. Die Zerkleinerung der ausgeschnittenen Gelstücke erfolgte durch Zentrifugation durch ein engmaschiges Nylonnetz. Anschließend wurde die DNA über Nacht in 1M NaCl, 10mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,6 aus den Gel-Resten eluiert und mit Ethanol gefällt.

4.2.7. Klonierung von DNA-Fragmenten in M13-Phagen-DNA und Transfektion

Die für Hybridisierungen und zur Sequenzierung benötigten Klone wurden konstruiert, indem isolierte DNA-Fragmente in die entsprechenden Spaltstellen der modifizierten M13-Phagen mp 8-11 (68) und mp 18, 19 (82) kloniert wurden. Die Vektor-DNA wurde, falls nur mit einem Enzym gespalten wurde, mit alkalischer Phosphatase (aus Kälberdarm, Boehringer) behandelt, um endständige Phosphatreste abzuspalten. Dadurch wird ein Religieren des Vektors vermieden (83). E. coli JM 103-Bakterien wurden nach der Vorschrift von Dagert und Ehrlich (84) behandelt, um die DNA-Aufnahme zu erleichtern.

Die Transfektion der kompetenten JM 103-Zellen wurde nach J. Messing (68) in einer Modifikation von K. Moore (38) durchgeführt. Rekombinante Klone bilden bei dieser Methode farblose Plaques aus, im Gegensatz zu Phagen ohne Fremd-DNA, die blaue Plaques bilden. Die rekombinanten Phagen aus farblosen Plaques wurden mit Hilfe steriler Zahnstocher in 5 ml logarithmisch wachsender E. coli JM 103-Zellen ($OD_{560} = 0.5$) übertragen und sechs Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde aus infizierten Bakterien die doppelsträngige Phagen-DNA isoliert (4.2.4.) und analysiert. Aus dem Kulturüberstand wurde die Einzelstrang-DNA der rekombinanten M13-Phagen isoliert (44), die bei der Sequenzierung (4.2.9.) als Template für die DNA-Polymerase I dient.

4.2.8. Auffüllen überhängender Enden und Linker-Addition

Zur Klonierung von Fragmenten, deren Enden nicht direkt in Spaltstellen der M13-Vektoren ligiert werden konnten, mußten die überhängenden Enden aufgefüllt und mit synthetischen Linkern versehen werden. Die Auffüll-Reaktion der isolierten DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der DNA-Polymerase I (Klenow Enzym/Boehringer) nach Ref. 75. Da die verwendeten synthetischen Eco RI-Linker (Boehringer) kein 5'-Phosphat trugen, wurden sie mit Polynukleotid-Kinase (aus T4-infizierten E.coli, Boehringer) phosphoryliert. Die phosphorylierten Linker wurden anschließend an die glatten Enden der DNA-Fragmente ligiert (85). Die Fragment-Enden konnten mit der Nuklease Eco RI gespalten und das Fragment in M13-DNA kloniert werden.

4.2.9. Sequenzierung

4.2.9.1. Sequenzierung nach Restriktionskarten

Bei dieser Sequenzierungsmethode wurden von DNA-Fragmenten, die mit Subgruppen-spezifischen Klonen hybridisiert, möglichst genaue Restriktionskarten erstellt (4.2.5.). Zur Sequenzierung geeignete Fragmente wurden isoliert (4.2.6.) und in die entsprechenden M13-Vektoren (mp 8-11 oder 18, 19) kloniert (4.2.7.). Die Sequenzierung dieser subklonierten Fragmente erfolgte nach der "Didesoxy-Kettenabbruch-Methode" (44). Die Didesoxyribonukleotid-Konzentrationen wurden so gewählt, daß Kettenabbrüche im Bereich bis etwa 800 bp noch spezifisch waren (38).

Zur Auftrennung der Oligonukleotide aus den Sequenzreaktionen wurden 6%ige Acrylamidgele verwendet (86). Um Sequenzreaktionen bis zu einer Länge von etwa 500 bp auswertbar aufzutrennen, wurde neben zwei verschiedenen langen Läufen auf 40 cm langen Gelen, ein Lauf auf einem 100 cm langen, temperierten Gel (55°C, 14 Stunden, 3500 V) durchgeführt (16). Die Apparatur entspricht denen, die in den Ref. 87 und 88 beschrieben wurden. Die Autoradiographie erfolgte bei -80°C mit Fuji RX-Filmen; die 100 cm-Gele wurden in 15%iger Essigsäure fixiert, getrocknet und bei Raumtemperatur exponiert.

4.2.9.2. Test eines neuen Sequenzierungs-Systems

Zur Vereinfachung der Sequenzierung sollte ein System, das von S. Beck und F.M. Pohl entwickelt wurde ("direct blotting"-Elektrophorese), etabliert werden (45). Dabei werden die Oligonukleotide aus den Reaktionen direkt nach Verlassen des Gels auf einer Membran (Biodyne A, Pall, Dreieich) fixiert, die am Gel-Ende mit konstanter

Geschwindigkeit vorbeigeführt wird. Mit Genehmigung von F.M. Pohl wurde eine Elektrophorese-Apparatur nachgebaut (45) und mit einem 14 cm langen Gel getestet. Abb. 10 zeigt das Ergebnis eines Testlaufs.

4.2.10. Computerprogramme

Die Auswertung aller Sequenzdaten erfolgte auf einem PDP-11/23 Prozessor unter Anwendung des RT-11-Systems (Digital Equipment). Es wurden Programme von R. Staden (89, 90) und P.S. Neumaier (20) verwendet. Die Programme von R. Staden wurden zur Zusammensetzung der Sequenzen benutzt, während die Programme DNTRAN (Translation einer Nukleotidsequenz in die Aminosäuresequenz), DNMAHO (Erzielen größtmöglicher Homologie zwischen DNA-Sequenzen) und DNPERC (Bestimmung der Divergenz zwischen DNA-Sequenzen) von P.S. Neumaier zu Sequenzvergleichen herangezogen wurden.

4.3. Biologische Sicherheit

Alle Experimente mit Klonen, die Human-DNA enthielten, wurden unter L2/B1-Bedingungen durchgeführt. Diese entsprachen den "Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in-vitro neukombinierte Nukleinsäuren" (4. überarbeitete Fassung des Bundesministeriums für Forschung und Technologie, August 1981).

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Teilaspekte innerhalb des Gesamtprojekts der Arbeitsgruppe untersucht. Das Ziel der Gruppe ist die Kartierung des menschlichen V_K -Locus in der Keimbahn-Konfiguration. Dadurch kann die Anzahl, der Abstand und die Orientierung der Mitglieder dieser Genfamilie festgelegt werden. Aus diesen Daten können Schlüsse über den Umlagerungsmechanismus und die Evolution der Genfamilie gezogen werden. Außerdem läßt sich die Frage beantworten, welche Bedeutung somatische Mutationen bei der Entstehung der Antikörpermoleküle haben.

Zunächst wurde eine Gruppe von Cosmiden charakterisiert, die mit Hilfe eines Subgruppe I-spezifischen Klon isoliert worden war. Es zeigte sich, daß diese Klone, statt eines V_K -Gensegments, L-Sequenzen enthielten. Diese von B. Straubinger erstmals beschriebene Sequenzfamilie (37) umfaßt etwa 10^2 Kopien, die sowohl isoliert im Genom vorkommen, als auch als Teil der 3'-Flanken von V_K -Gensegmenten der Subgruppe I.

Hauptbestandteil der Arbeit war die genaue Analyse einer Gruppe überlappender Cosmide (Region Chr. 22), die etwa 50 kb genomischer DNA umfaßt und drei V_K -Gensegmente enthält. Durch Hybridisierung mit Subgruppen-spezifischen Klonen konnten diese Gensegmente verschiedenen Subgruppen zugeordnet werden. Neben diesen überlappenden Cosmid-klonen existierten zwei Klone, die nur teilweise homolog zur Region Chr. 22 sind und daher genauer untersucht werden sollten. Dabei sollte geklärt werden, ob diese Cosmide Ligierungsartefakte oder zur Chr. 22-Region unterschiedliche genomische Bereiche darstellen. Durch genauere Kartierung von isolierten Fragmenten, durch Hybridisierungs-Experimente mit verschiedenen Subklonen und

Sequenzierung sollte versucht werden, diese Frage zu beantworten. Die Ergebnisse dieser Analysen sprechen dafür, daß diese Cosmide durch Ligierung verschiedener Fragmente bei der Genbank-Konstruktion entstanden sind.

Zur weiteren Untersuchung der Region Chr. 22 sollte diese zunächst nach beiden Seiten verlängert werden, um möglicherweise zusätzliche Gensegmente zu finden. Dazu wurden mehrere Cosmidisolierungs-Versuche aus Human-Genbanken mit unterschiedlichen Klonen durchgeführt. Es wurden sowohl Subgruppen-spezifische Klone, als auch Klone, die für die analysierte Region spezifisch sind, eingesetzt. Auf diese Weise konnten Cosmide zur 5'-Extension gefunden werden, die die ursprüngliche Situation um 30 kb erweitern und keine zusätzlichen Gensegmente enthalten. Cosmide, die mit den Klonen zur 3'-Extension isoliert wurden, erweitern die bestehende Situation nicht.

Da auch bei Extensions-Versuchen anderer Mitarbeiter über weite Bereiche keine zusätzlichen V_K -Gensegmente gefunden wurden, sollte die chromosomale Lokalisierung der in der Arbeitsgruppe charakterisierten Cosmide bzw. Regionen festgelegt werden. In Zusammenarbeit mit Kollegen konnte die analysierte, genomische Region mit Hilfe spezifischer Klone durch Hybridisierung von Mensch-Maus- bzw. Mensch-Hamster-Zellhybrid-DNA auf Chromosom 22 lokalisiert werden. Sie ist somit nicht Bestandteil des V_K -Locus, der auf Chromosom 2 liegt.

Aufgrund der Translokation dieser Region war es interessant, die Nukleotidsequenzen der Gensegmente zu bestimmen. Die Sequenzanalyse der drei V_K -Gensegmente zeigte, daß es sich um Pseudogene verschiedener Subgruppen handelt, die in gleicher Orientierung vorliegen. Diese Ergebnisse sind eine weitere Bestätigung dafür, daß die Gensegmente der Subgruppen untereinander vermischt vorkommen und, daß die V_K -Genfamilie einen großen Anteil an Pseudogenen enthält. Dies scheint bei Multigenfamilien,

die häufigen Veränderungen unterworfen sind, keine Seltenheit zu sein. Sequenz-Vergleiche der Gensegmente der Region Chr. 22 mit funktionellen V_K -Gensegmenten zeigten eine starke Divergenz zwischen den verglichenen Sequenzen. Dies deutet darauf hin, daß die translozierten Gensegmente nicht mehr oder in einem geringeren Maß der Kontrolle durch Genkonversion-ähnliche Prozesse unterliegen, die zwischen Gensegmenten des V_K -Locus wirksam sind (20).

Zur 3'-Extension der Region Chr. 22 wurden Cosmidisolierungs-Versuche mit Subgruppe III-spezifischen Klonen durchgeführt. Dabei sollten auch die V_K -Gensegmente dieser Subgruppe möglichst vollständig isoliert werden. Es gelang, eine Vielzahl von V_K -Gensegment-enthaltenden Cosmidklonen zu isolieren und einen Großteil davon in ersten Analysen bereits charakterisierten Regionen zu zuordnen. Da es bisher keine genauen Daten über die Anzahl der Subgruppe III-Gensegmente gibt und diese Subgruppe sehr heterogene Mitglieder umfaßt, ist nicht gesichert, daß durch die isolierten Cosmide alle Subgruppe III-Gensegmente repräsentiert werden. In Verbindung mit diesen Experimenten konnten mit einem L-Region-spezifischen Klon Cosmide, die diese Region extendieren sollten, isoliert werden.

Durch die Region Chr. 22 und zwei weitere, einzelne V_K -Gensegmente konnte erstmals die Translokation von nicht-prozessierten Pseudogenen der V_K -Genfamilie auf andere Chromosomen beschrieben werden (25). Bisher war diese Genfamilie ausschließlich auf Chromosom 2 lokalisiert worden. Da die Translokation dieser Gengruppe mit Transposition oder Genkonversion schwer zu erklären ist, muß möglicherweise ein neuer Rekombinations-Mechanismus angenommen werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. S. Tonegawa, Nature 302, 575-581 (1984)
2. L.E. Hood, J.L. Weissman, W.B. Wood und J.H. Wilson
Immunology 2.Edition, Benjamin Cummings (1984)
3. J.M. Roitt, Essential Immunology, Blackwell
Scientific Publications 4.Edition (1980)
4. T. Honjo, Ann. Rev. Immunol. 1, 499-528 (1983)
5. T. Honjo und S. Habu, Ann. Rev. Biochem. 54, 803-
830 (1985)
6. E.E. Max, J.G. Seidman und P. Leder, Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 76, 3450-3456 (1979)
7. A. Shimizu und T. Honjo, Cell 36, 801-803 (1984)
8. F. Alt, N. Rosenberg, S. Lewis, E. Thomas und
D. Baltimore, Cell 27, 381-390 (1981)
9. S.J. Korsmeyer, P.A. Hieter, J.V. Ravetch, D.G.
Poplack, T.A. Waldmann und P. Leder, Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 78, 7086-7100 (1981)
10. D.R. Davies, E.A. Padlan und D.A. Segal, Ann. Rev.
Biochem. 44, 639-664 (1975)
11. C. Milstein, Nature 216, 330-332 (1965)
12. E.A. Kabat, T.T. Wu, H. Bilowsky, M. Reid-Miller und
H. Perry, Sequenzen of Proteins of Immunological
Interest (1983), U.S. Department of Health and Human
Services, Bethesda
13. J. Stavnezer, D. Kekish, D. Batter, J. Grenier, J.
Balazs, E. Henderson und B.J.M. Zegers, Nucl. Acids
Res. 13, 3495-3513 (1985)
14. D.L. Bentley und T.H. Rabbitts, Cell 24, 613-623
(1981)
15. B. Hohn und J. Collins, Gene 11, 291-298 (1980)
16. H.R. Jaenichen, M. Pech, W. Lindenmaier, N. Wild-
gruber und H.G. Zachau, Nucl. Acids Res. 12, 5249-
5263 (1984)

17. H.G. Klobeck, A. Solomon und H.G. Zachau, *Nature* 309, 73-76 (1984)
18. H.G. Klobeck, A. Meindl, G. Combriato, A. Solomon und H.G. Zachau, *Nucl. Acids Res.* 13, 6499-6513 (1985)
19. H.G. Klobeck, G.W. Bornkamm, G. Combriato, R. Mocikat, H.D. Pohlenz und H.G. Zachau, *Nucl. Acids Res.* 13, 6515-6529 (1985)
20. M. Pech, H.R. Jaenichen, H.D. Pohlenz, P.S. Neumaier, H.G. Klobeck und H.G. Zachau, *J. Mol. Biol.* 176, 184-204 (1984)
21. M. Pech und H.G. Zachau, *Nucl. Acids Res.* 12, 9229-9236 (1984)
22. M. Pech, H. Smola, H.D. Pohlenz, B. Straubinger, R. Gerl und H.G. Zachau, *J. Mol. Biol.* 183, 291-299 (1985)
23. H.D. Pohlenz, Dissertation, Fachbereich für Chemie und Pharmazie, Universität München (1986)
24. B. Straubinger, Dissertation, Fachbereich f. Chemie und Pharmazie, Universität München (1986)
25. E. Lötscher, K.H. Grzeschik, H.G. Bauer, H.D. Pohlenz, B. Straubinger und H.G. Zachau, *Nature*, im Druck
26. D. Ish-Horowicz und J.F. Burke, *Nucl. Acids Res.* 9, 2989-2998 (1981)
27. L. Clark und J. Carbon, *Cell* 9, 91-99 (1976)
28. O.W. McBride, P.A. Hieter, G.F. Hollis, D. Swan, M.C. Otey und P. Leder, *J. Exp. Med.* 155, 1480-1490 (1982)
29. S. Malcolm, P. Barton, C. Murphy, M.A. Ferguson-Smith, D.L. Bentley und T.H. Rabbitts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4955-4961 (1982)
30. F. Sanger, A.R. Coulson, G.F. Hong, D.F. Hill und G.B. Petersen, *J. Mol. Biol.* 162, 729-773 (1982)
31. H. Smola, Dissertation, Fachbereich für Medizin, Universität München (1986)
32. E. Lötscher, Dissertation, Fachbereich für Biologie, Universität München
33. E. Huber, Dissertation, Fachbereich für Biologie, Universität München

34. D.K. Ledford, F. Goni, M. Pizzolato, E.C. Franklin, A. Solomon und B. Frangione, J. Immunology 131, 1322-1326 (1983)
35. F.J. Zimmer, Dissertation, Fachbereich für Chemie und Pharmazie, Universität München
36. W. Lorenz, Dissertation, Fachbereich für Biologie, Universität München
37. B. Straubinger, M. Pech, K. Mühlebach, H.R. Jaenichen H.G. Bauer und H.G. Zachau, Nucl. Acids Res. 12, 5265-5275 (1984)
38. H.R. Jaenichen, Dissertation, Fachbereich für Biologie, Universität München (1984)
39. K. Mühlebach, Diplomarbeit, Fachbereich für Chemie und Pharmazie, Universität München (1982)
40. N. Wildgruber, Diplomarbeit, Fachbereich für Biologie Universität München (1984)
41. D.L. Bentley und T.H. Rabbitts, Cell 32, 181-189 (1983)
42. W. Pargent, Dissertation, Fachbereich für Biologie, Universität München
43. P. D'Eustachio und F.H. Ruddle, Science 220, 919-924 (1983)
44. F. Sanger, A.R. Coulson, B.G. Barnell, A.J.H. Smith und B.A. Roe, J. Mol. Biol. 143, 161-178 (1980)
45. S. Beck und F.M. Pohl, EMBO J. 3, 2905-2909 (1984)
46. F.G. Falkner und H.G. Zachau, Nature 310, 71-74 (1984)
47. R. Breathnach und P. Chambon, Ann. Rev. Biochem. 50, 349-383 (1981)
48. H. Sakano, K. Hüppi, G. Heinrich und S. Tonegawa, Nature 280, 288-294 (1979)
49. E.E. Max, J.G. Seidman und P. Leder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3450-3454 (1979)
50. L. Hood, M. Steinmetz und B. Malissen, Ann. Rev. Immunol. 1, 529-568 (1983)
51. M. Steinmetz, A. Winoto, K. Minard und L. Hood, Cell 28, 489-498 (1982)

52. D.L. Bentley, Nature 307, 77-80 (1984)
53. D. Swan, P. D'Eustachio, L. Leinwand, J. Seidman, D. Keithley und F.H. Ruddle, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2735-2739 (1976)
54. A. Leder, D. Swan, F. Ruddle, P. D'Eustachio und P. Leder, Nature 293, 196-200 (1981)
55. E.F. Vanin, Biochim. Biophys. Acta 782, 231-341 (1984)
56. G.F. Hollis, P.A. Hieter, O.W. McBride, D. Swan und P. Leder, Nature 296, 321-325 (1982)
57. S. Ueda, S. Nakai, Y. Nishida, H. Hsijima und T. Honjo, EMBO J. 1, 1539-1544 (1982)
58. G. Rechavi, D. Ram, L. Glazer, R. Zakut und D. Givol, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 855-859 (1983)
59. K. Lueders, A. Leder, P. Leder und E. Kuff, Nature 295, 426-428 (1982)
60. J. Erikson, J. Martines und C.M. Croce, Nature 294, 173-175 (1981)
61. D.L. Bentley und T.H. Rabbitts, Nature 288, 730-732 (1980)
62. N. Proudfoot, Nature 286, 840-841 (1980)
63. L. Hood, J. H. Campbell und S.C.R. Elgin, Ann. Rev. Genet. 9, 305-353 (1975)
64. P.H. Brodeur und R. Riblet, Eur. J. Immunol. 14, 922-930 (1984)
65. G. Rechavi, B. Bienz, D. Ram, Y. Ben-Nerich, J. B. Cohen, R. Zakut und D. Givol, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4405-4409 (1982)
66. J. Höchtl, C.R. Müller und H.G. Zachau, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1383-1387 (1982)
67. S. Lewis, N. Rosenberg, F. Alt und D. Baltimore, Cell 30, 807-816 (1982)
68. J. Messing, Methods in Enzymology Vol. 101, 20-78 (1983)
69. P.W.J. Rigby, M. Dieckmann, C. Rhodes und P. Berg, J. Mol. Biol. 113, 237-251 (1977)

70. E. M. Southern, J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975)
71. H. Schnell, M. Steinmetz, H.G. Zachau und I. Schechter, Nature 286, 170-173 (1980)
72. D.T. Denhardt, Biochem. Biophys. Res. Comm. 23, 641-646 (1966)
73. J. Meinkoth und G. Wahl, Analyt. Biochemistry 138, 267-284 (1984)
74. M. Grunstein und D.S. Hogness, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 3961- 3965 (1975)
75. T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)
76. H.C. Birnboim und J. Doly, Nucl. Acids Res. 7, 1513-1524 (1979)
77. T. Tanaka und B. Weißblum, J. Bacteriol. 121, 354-362 (1975)
78. C. Aaij und P. Borst, Biochim. Biophys. Acta 269,192-200 (1972)
79. A.C. Peacock und C.W. Dingman, Biochemistry 6, 1818-1827 (1967)
80. U.E. Loehning, Biochem. J. 113, 131-138 (1969)
81. J. Gafner, E.M. de Robertis und P. Phillipsen, EMBO J. 2, 583-591 (1983)
82. J. Norrander, T. Kempe und J. Messing, Gene 26, 101-107 (1983)
83. A. Ullrich, J.Shine, J. Chirgwin, R. Pictet, E. Tischer, W.J. Rutter und H.M. Goodman, Science 196, 1313-1319 (1977)
84. M. Dagert und S.D. Ehrlich, Gene 6, 23-28 (1978)
85. T. Maniatis, R.C. Hardison, E. Lacy, J. Lauer, C. O'Connell, D. Quon, D.K. Sim und A. Efstratiadis, Cell 15, 687-705 (1978)
86. F. Sanger, S. Nicklen und A.R. Coulson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977)
87. H. Garoff und W. Ansorge, Anal. Biochem. 115, 450-457 (1981)
88. W. Ansorge und R. Barker, J. Biochem. Biophys.Methods 9, 33-47 (1984)

89. R. Staden, Nucl. Acids Res. 5, 1013-1015 (1978)
90. R. Staden, Nucl. Acids Res. 8, 3673-3694 (1980)
91. H.O. Smith und D. Nathans, J. Mol. Biol. 81, 419-423 (1973)
92. "Abbreviations and Symbols for Nucleic Acids, Polynucleotides and their Constituents", Eur. J. Biochem. 15, 203-208 (1970)
93. "Abbreviations and Symbols", Eur. J. Biochem. 74, 1-6 (1977)

7. ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar
C	konstante Region der Immunglobuline
CDR	"complementarity determining region": hypervariable Regionen in den V-Regionen der leichten und schweren Ketten
D	"diversity"-Segment: Gensegment der V-Region der schweren Ketten
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure (Natriumsalz)
FR	"framework region": konstante Bereiche in den V-Regionen der leichten und schweren Ketten
J	"joining"-Region (Verbindungsregion), bei k-Ketten Aminosäure 96 - 108
kb	Kilobasen (1000 bp)
OD	optische Dichte
Ref.	Referenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard-Saline-Citrat (150mM NaCl, 15mM Natriumcitrat, pH 7,0)
V	variable Region der Immunglobuline
V_K , V_λ	variable Region der leichten Ketten vom k- bzw. λ -Typ

- cos 10 - 49: Cosmide aus Genbank I mit pHc 79-Vektor (16)
- cos 50 - 99: Cosmide aus Genbank II mit pHc 79/2cos/tk-Vektor (16)
- cos 100 ff.: Cosmide aus Genbank III mit pHc 79- oder pJB 8-Vektor (23)
- cos 500 ff.: Cosmide aus Genbank IV (Taq I-Partialspaltung) (24)
- cos 650 ff.: Cosmide aus Genbank IV (Msp I-Partialspaltung) (24)

DNA-Fragmente und Subklone werden durch die Nummer des Ursprungs-Cosmids und eine Zahl gekennzeichnet; dazu kommt die Vektorbezeichnung p (pBR 322) oder m (M13), z.B. m 120-10.

Die Bezeichnungen der Restriktionsnukleasen entsprechen den in Ref. 91 gegebenen Empfehlungen. Alle anderen Angaben wurden gemäß Empfehlungen der "IUPAC-IUB. Commission on Biochemical Nomenclature" gemacht, die in den Ref. 92 und 93 beschrieben sind.

LEBENS LAUF

Ich wurde am 19.1.1954 in Ulm (Baden-Württemberg) geboren. Von 1960-65 besuchte ich die Volksschule in Vöhringen (Iller), dann das Gymnasium in Illertissen (Bayern), wo ich 1974 die Reifeprüfung ablegte. Im Sommersemester 1975 begann ich an der Universität Tübingen mit dem Studium der Chemie. Im Oktober 1976 wechselte ich das Studienfach und studierte Biologie. Nach der Diplomprüfung im April 1981 fertigte ich in Tübingen am Institut für Mikrobiologie, Prof. V. Braun, unter der Anleitung von Dr. K. Handtke die Diplomarbeit an. Diese hatte den Titel "Zur Methodik der Serratia-Genetik". Seit Mai 1982 arbeitete ich am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München unter Anleitung von Prof. H.G. Zachau an der vorliegenden Dissertation.

